

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 9 月 29 日 (29.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/090580 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/65, 15/55, A01K 67/027,
C12N 5/10, C12Q 1/42, G01N 33/15, 33/50, 33/68

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/005257

(22) 国際出願日: 2005 年 3 月 23 日 (23.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-084810 2004 年 3 月 23 日 (23.03.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザ
イ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1128088 東
京都文京区小石川 4 丁目 6 番 1 0 号 Tokyo (JP).

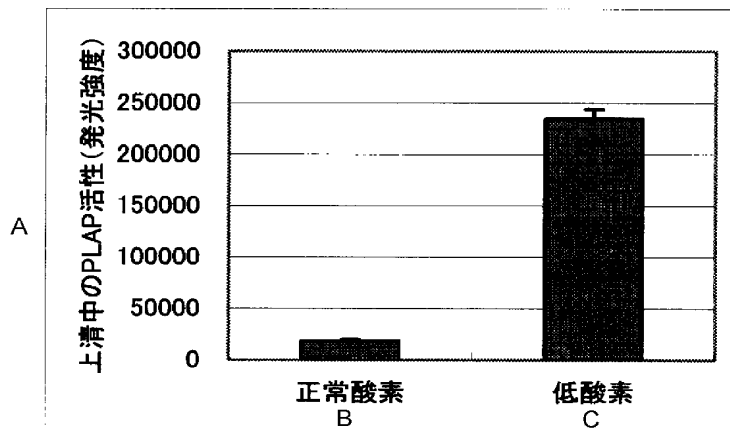
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岡本 淳
(OKAMOTO, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒3002635 茨城県つ
くば市東光台 5 丁目 1 番地 3 エーザイ株式会社
筑波研究所内 Ibaraki (JP). 川村 高紀 (KAWAMURA,
Takanori) [JP/JP]; 〒3002635 茨城県つくば市東光
台 5 丁目 1 番地 3 エーザイ株式会社 筑波研究所
内 Ibaraki (JP). 浅野 誠 (ASANO, Makoto) [JP/JP]; 〒
3002635 茨城県つくば市東光台 5 丁目 1 番地 3 エー
ザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP). 下窪 大哉
(SHITAKUBO, Daiya) [JP/JP]; 〒3002635 茨城県つく
ば市東光台 5 丁目 1 番地 3 エーザイ株式会社 筑波
研究所内 Ibaraki (JP). 白戸 学 (SHIRATO, Manabu)
[JP/JP]; 〒3002635 茨城県つくば市東光台 5 丁目 1 番
地 3 エーザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP). 浅
田 誠 (ASADA, Makoto) [JP/JP]; 〒3002635 茨城県つ

[続葉有]

(54) Title: USING NONHUMAN ANIMAL MODEL, METHOD OF MEASURING TRANSCRIPTION ACTIVITY, METHOD OF MEASURING CELL QUANTITY AND METHOD OF MEASURING TUMOR VOLUME

(54) 発明の名称: 非ヒト動物モデルにおける転写活性測定方法、細胞数の測定方法及び腫瘍体積の測定方法



A IN-SUPERNATANT PLAP ACTIVITY
(LUMINESCENCE INTENSITY)
B NORMAL OXYGEN
C LOW OXYGEN

(57) Abstract: With respect to a nonhuman animal model capable of producing a secretory protein obtained by transplanting cells having a secretory protein expression vector introduced therein into a nonhuman animal, the quantity of secretory protein is measured. With the use of the resultant secretory protein quantity as an indicator, the transcription activity, transplanted cell quantity or tumor volume is measured. Further, with the use of the nonhuman animal model whereto a compound has been administered, there is conducted a screening of compound affecting the transcription activity, transplanted cell quantity or tumor volume.

(57) 要約: 分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌タンパク質を産生する非ヒト動物モデルにおいて、該分泌タンパク質量を測定することにより、得られた分泌タンパク質量を指標として、転写活性、

[続葉有]

WO 2005/090580 A1



くば市東光台5丁目1番地3 エーザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 アクロポリス21ビル6階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

非ヒト動物モデルにおける転写活性測定方法、細胞数の測定方法及び
腫瘍体積の測定方法

技術分野

[0001] 本発明は、非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性を測定する方法、移植細胞数を測定する方法および腫瘍体積を測定する方法に関するものである。

背景技術

[0002] 転写を調節することによりタンパク質の発現量を調節することが、タンパク質の機能発現において重要な役割を果たしていることが知られている。この転写調節を制御することによる各種疾患の治療剤の開発が試みられている。そして、このような薬剤の開発には、転写活性を適切に評価する方法が不可欠である。これまで、培養細胞 (in vitro) における転写活性の測定方法は数多く報告されている。しかしながら、非ヒト動物モデル (in vivo) において、適切に転写活性を測定する方法はほとんど知られていない。

また、非ヒト動物モデルに移植した培養細胞の細胞数を測定することは、特に、抗腫瘍剤の開発において重要な役割を果たしている。しかしながら、非侵襲的かつ簡便に当該細胞数を測定する方法はほとんど知られていない。

[0003] 従来、非ヒト動物モデルにおいて、転写活性を測定する方法としては、ノザンブロッティングによるmRNAの発現解析 (非特許文献1) やレポーター遺伝子として β -Gal 遺伝子を用いた方法 (非特許文献2) が用いられてきた。しかし、これらの方法は、mRNAを抽出したり、組織切片を作製したりするような煩雑な作業を伴うため処理能力が著しく低いという問題がある。また、転写活性の測定のために、組織を摘出する必要があるため、経時的な変化を調べることは困難である。

[0004] また、近年、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いた方法が報告されている (非特許文献3)。しかし、この方法では、転写活性を測定するために、ルシフェラーゼ遺伝子を導入した培養細胞をマウスに移植し、当該マウスを麻酔した後にルシフェラーゼの基質を静脈内注射し、暗室内にてルシフェラーゼ活性による発光

を撮影して画像解析する必要がある。

このため、この方法では、特殊な装置を必要とすること、上記のような煩雑な作業を伴うこと、麻酔の影響があること、定量性に欠けること等が問題となる。

[0005] 一方、非ヒト動物モデルに移植した培養細胞の細胞数を測定する方法としては、予め色素で染色した細胞を移植する方法(非特許文献4)が用いられてきた。しかし、この方法は、組織を摘出するという煩雑な作業を伴うため処理能力が著しく低いという問題がある。また、組織を摘出する必要があるため、経時的な変化を調べることは困難である。さらには、移植した培養細胞が細胞分裂をするごとに色素が減少するため、測定感度に問題がある。

[0006] また、非ヒト動物モデルに移植した培養細胞の細胞数を測定する手段としてレポーター遺伝子としてGFP遺伝子を用いた方法がAnti Cancer社から報告されている(非特許文献5)。この方法では、GFP遺伝子の上流に恒常的転写制御配列を連結したプラスミドを腫瘍細胞に導入し、当該腫瘍細胞をマウスに移植し、蛍光顕微鏡によって当該マウスの臓器を撮影し、画像解析することによって、細胞数を測定する。しかし、この方法では、当該マウスの内臓や脳などに移植した腫瘍細胞の細胞数を測定するためには、当該マウスを開腹または開頭して蛍光顕微鏡撮影する必要がある。このため、侵襲的かつ煩雑であり、また、麻酔の影響、定量性についても問題があった。
非特許文献1: Molecluar Cloning, A Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring Harbor Press (2001) Section 7.42)

非特許文献2: Kucharczuk, et. al. (1999) Development 126(9): 1957-1965

非特許文献3: Shoemaker. The 7th International Symposium on Cancer Chemotherapy, Tokyo, 2002

非特許文献4: Yamagata, et. al. (2000) Journal of experimental & clinical cancer research, 19(2): 211-217

非特許文献5: Yang, et. al. (1999) Cancer Research 59(4): 781-786

発明の開示

[0007] 本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その解決しようとする課題は、非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写制御配列を介した転写活性を非侵

襲的、簡便かつ精度よく測定する方法および転写制御配列を介した転写活性に影響を与える化合物を非侵襲的、簡便かつ精度よくスクリーニングする方法、非ヒト動物モデルにおける移植細胞数を非侵襲的、簡便かつ精度よく測定する方法および移植細胞数に影響を与える化合物を非侵襲的、簡便かつ精度よくスクリーニングする方法ならびに非ヒト動物モデルにおける腫瘍体積を非侵襲的、簡便かつ精度よく測定する方法および腫瘍体積に影響を与える化合物を非侵襲的、簡便かつ精度よくスクリーニングする方法を確立することにある。

- [0008] 本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意検討を重ねた結果、分泌型に改変した胎盤由来アルカリフォスファターゼ（以下、「PLAP」と称する場合がある）遺伝子の upstream に転写制御配列を挿入した PLAP レポータープラスミドを作製し、この PLAP レポータープラスミドを導入した培養細胞を非ヒト動物に移植して、当該非ヒト動物モデルの血中のアルカリフォスファターゼ活性を測定することにより、当該転写制御配列の転写活性を測定できることを見出した。
- [0009] また、PLAP レポータープラスミドを導入した培養細胞を移植した非ヒト動物モデルに化合物を投与し、当該非ヒト動物モデルの血中のアルカリフォスファターゼ活性を測定することにより、非ヒト動物モデルにおいて、転写制御配列を介した転写活性に影響を与える化合物を非侵襲的、簡便かつ精度よくスクリーニングできることを見出した。
- [0010] さらに、転写制御配列として恒常的転写制御配列を用いて、PLAP レポータープラスミドを作製し、この PLAP レポータープラスミドを導入した培養細胞を非ヒト動物モデルに移植して、得られた非ヒト動物モデルの血中のアルカリフォスファターゼ活性を測定することにより、非ヒト動物モデルにおいて、移植細胞数および腫瘍体積を測定できることならびに移植細胞数および腫瘍体積に影響を与える化合物を非侵襲的、簡便かつ精度よくスクリーニングしうることを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0011] すなわち本発明は、以下に関する。
- (1) 非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性を測定する方法であって、転写制御配列及びそれに機能的に結合された分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を非ヒト動物に移植することによって得

られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルにおいて、当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標として、転写制御配列を介した転写活性を測定する、前記方法。

(2) 転写制御配列が、転写制御因子結合配列を含むものである、(1)の方法。

(3) 転写制御因子結合配列が、配列番号:1、配列番号:2、配列番号:3、配列番号:4、配列番号:5、配列番号:6、配列番号:7および配列番号:8からなる群から選択される少なくとも一つの配列である、(2)の方法。

(4) 分泌型タンパク質が、分泌型の酵素である(1)〜(3)のいずれかの方法。

(5) 分泌型の酵素が、分泌型アルカリフォスファターゼである、(4)の方法。

(6) 分泌型アルカリフォスファターゼが、耐熱性の分泌型アルカリフォスファターゼである、(5)の方法。

(7) 分泌型アルカリフォスファターゼが、分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼである、(5)の方法。

(8) 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼが、配列番号:11で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質である、(7)の方法。

(9) 血中の分泌タンパク質量を測定することを特徴とする、(1)〜(8)のいずれかの方法。

(10) 血中の分泌タンパク質量の測定が、酵素活性測定により行うものである、(9)の方法。

(11) 酵素活性が、アルカリフォスファターゼ活性である、(10)の方法。

(12) 細胞が、腫瘍細胞または不死化細胞である、(1)〜(11)のいずれかの方法。

(13) 転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルに化合物を投与する工程と、

(b) (1)〜(12)のいずれかの方法により、前記化合物を投与された非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性を測定する工程と、

を含む、前記方法。

(14) 転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 化合物を投与された非ヒト動物に分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を移植する工程と、

(b) (1)～(12)のいずれかの方法により、前記細胞を移植された非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性を測定する工程と、

を含む、前記方法。

(15) 非ヒト動物モデルにおける移植細胞数を測定する方法であって、転写制御配列及びそれに機能的に結合された分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルにおいて、当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標として移植細胞数を測定する、前記方法。

(16) 分泌型タンパク質が、分泌型の酵素である(15)の方法。

(17) 分泌型の酵素が、分泌型アルカリフォスファターゼである、(16)の方法。

(18) 分泌型アルカリフォスファターゼが、耐熱性の分泌型アルカリフォスファターゼである、(17)の方法。

(19) 分泌型アルカリフォスファターゼが、分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼである、(17)の方法。

(20) 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼが、配列番号:11で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質である、(19)の方法。

(21) 血中の分泌タンパク質量を測定することを特徴とする、(15)～(20)のいずれかの方法。

(22) 血中の分泌タンパク質量の測定が、酵素活性測定により行うものである、(21)の方法。

(23) 酵素活性が、アルカリフォスファターゼ活性である(22)の方法。

(24) 細胞が、腫瘍細胞または不死化細胞である、(15)～(23)のいずれかの方法。

(25) 転写制御配列が、恒常的転写制御配列を含むものである、(15)～(24)のいずれかの方法。

(26) 恒常的転写制御配列が、SV40プロモーター、CMVプロモーター、チミジンキナ

ーゼプロモーター、Ubiquitin Cプロモーター、Elongation factor 1 alpha (EF1a) プロモーター、 β -actinプロモーター、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase プロモーター、Phosphoglycerokinaseプロモーター、 β 2-Microglobulinプロモーターおよび β -Glucuronidaseプロモーターからなる群から選択される少なくとも一つの配列である、(25)の方法。

(27)恒常的転写制御配列が、SV40プロモーターである、(25)の方法。

(28)恒常的転写制御配列が、配列番号:9で表される配列である、(25)の方法。

(29)移植細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングする方法であって、

(a)分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルに化合物を投与する工程と、

(b) (15)ー(28)のいずれかの方法により、前記化合物を投与された非ヒト動物モデルにおける移植細胞数を測定する工程と、

を含む、前記方法。

(30)移植細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングする方法であって、

(a)化合物を投与された非ヒト動物に分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を移植する工程と、

(b) (15)ー(28)のいずれかの方法により、前記細胞を移植された非ヒト動物における移植細胞数を測定する工程と、

を含む、前記方法。

(31)非ヒト動物モデルにおける腫瘍体積を測定する方法であって、転写制御配列及びそれに機能的に結合された分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた腫瘍を生じ当該腫瘍において分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルにおいて、当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標として、腫瘍体積を測定する、前記方法。

(32)分泌型タンパク質が、分泌型の酵素である(31)の方法。

(33)分泌型の酵素が、分泌型アルカリフォスファターゼである、(32)の方法。

(34) 分泌型アルカリフォスファターゼが、耐熱性の分泌型アルカリフォスファターゼである、(33)の方法。

(35) 分泌型アルカリフォスファターゼが、分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼである、(33)の方法。

(36) 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼが、配列番号:11で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質である、(35)の方法。

(37) 血中の分泌タンパク質量を測定することを特徴とする、(31)－(36)のいずれかの方法。

(38) 血中の分泌タンパク質量の測定が、酵素活性測定により行うものである、(37)の方法。

(39) 酵素活性が、アルカリフォスファターゼ活性である(38)の方法。

(40) 細胞が、腫瘍細胞または不死化細胞である、(31)－(39)のいずれかの方法。

(41) 転写制御配列が、恒常的転写制御配列を含むものである、(31)－(40)のいずれかの方法。

(42) 恒常的転写制御配列が、SV40プロモーター、CMVプロモーター、チミジンキナーゼプロモーター、Ubiquitin Cプロモーター、Elongation factor 1 alpha (EF1a) プロモーター、 β -actinプロモーター、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase プロモーター、Phosphoglycerokinaseプロモーター、 β 2-Microglobulinプロモーターおよび β -Glucuronidaseプロモーターからなる群から選択される少なくとも一つの配列である、(41)の方法。

(43) 恒常的転写制御配列が、SV40プロモーターである、(41)の方法。

(44) 恒常的転写制御配列が、配列番号:9で表される配列である、(41)の方法。

(45) 腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた腫瘍細胞を生じ当該腫瘍細胞において分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルに化合物を投与する工程と、
(b) (31)－(44)のいずれかの方法により、前記化合物を投与された非ヒト動物モデルにおける腫瘍体積を測定する工程と、

を含む、前記方法。

(46) (1)～(45)のいずれかの方法に用いるための、分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

(47) (1)～(45)のいずれかの方法に用いるための、分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞。

(48) (1)～(45)のいずれかの測定方法に用いるための、分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物。

(49) (1)～(45)のいずれかの方法に用いるための、分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含有する測定キット。

(50) (1)～(45)のいずれかの方法に用いるための、分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を含有する測定キット。

(51) (1)～(45)のいずれかの方法に用いるための、分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物を含有する測定キット。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、PLAP basicベクタープラスミドの構造を示す。

[図2]図2は、HRE-PLAPレポータープラスミドの構造を示す。

[図3]図3は、HRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞のPLAP活性の解析結果を示す。

[図4]図4は、HRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞をヌードマウスに皮下移植した実験の結果を示す。図中黒丸は血中PLAP活性、白三角は腫瘍体積を示す。横軸は移植後の日数を示す。

[図5]図5は、dsRNA発現ベクタープラスミドの構造を示す。

[図6]図6は、HIF-1 α dsRNA発現ベクタープラスミドの構造を示す。

[図7]図7は、HIF-1 α dsRNA発現プラスミド安定導入細胞のPLAP活性の解析結果を示す。PLAP産生の低酸素誘導率は、低酸素濃度(2%)培養での培地中PLAP活性値を通常酸素濃度(21%)培養での培地中PLAP活性値で除して求めた。

[図8]図8は、HIF-1 α dsRNA発現プラスミド安定導入細胞のHIF-1 α mRNA量の解析結果を示す。

[図9]図9は、HIF-1 α dsRNA発現プラスミド安定導入細胞クローン2D4およびコントロールクローンMD2をヌードマウスに皮下移植した実験の結果を示す。図中丸印は血中PLAP活性、三角印は腫瘍体積を示し、それぞれ黒印はクローンMD2、白印はクローン2D4を示す。横軸は移植後の日数を示す。

[図10]図10は、HRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞を皮下移植したヌードマウスに、抗VEGF抗体を投与した実験の結果を示す。図中丸印は血中PLAP活性、三角印は腫瘍体積を示し、それぞれ黒印は抗VEGF抗体投与群、白印はコントロール群を示す。横軸は治療開始後の日数を示す。

[図11]図11は、HRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞をヌードマウスに腹腔内移植した実験の結果を示す。図中の各系列は各個体の血中PLAP活性を示す。横軸は移植後の日数を示す。

[図12]図12は、VEGF-PLAPレポータープラスミドの構造を示す。

[図13]図13は、VEGF-PLAPレポータープラスミド導入細胞をヌードマウスに頭蓋内移植した実験の結果を示す。図中の各系列は各個体の血中PLAP活性を示す。横軸は移植後の日数を示す。

[図14]図14は、pCREBP2x2-tkPLAPベクターの構造を示す。

[図15]図15は、pCRBP2x2-TK promoter-PLAP basicベクターの構造を示す。

[図16]図16は、STAT6-PLAPレポータープラスミドの構造を示す。

[図17]図17は、STAT6発現ベクタープラスミドの構造を示す。

[図18]図18は、STAT6-PLAPレポータープラスミド、STAT6発現ベクタープラスミドを導入し、安定発現細胞のヒトIL4非刺激又は刺激24時間後のPLAP活性の解析結果を示す。

[図19]図19は、STAT6-PLAPレポータープラスミド、STAT6発現ベクタープラスミド安定発現細胞をマウスの背部空気嚢内に移植し、ヒトIL4非刺激又は刺激24時間後の血中PLAP活性の解析結果を示す。

[図20]図20は、STAT6-PLAPレポータープラスミド、STAT6発現ベクタープラスミド安

定発現細胞をマウスの背部空気嚢内に移植し、ヒト IL4刺激24時間後における被検化合物投与群と対象群の血中PLAP活性の解析結果を示す。

[図21]図21は、SV40-PLAPレポータープラスミドの構造を示す。

[図22]図22は、SV40-PLAPレポータープラスミド導入細胞をヌードマウスに皮下移植した実験の結果を示す。図中黒丸は血中PLAP活性、白三角は腫瘍体積を示す。横軸は移植後の日数を示す。

発明を実施するための最良の形態

[0013] 以下に本発明の実施の形態について説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施の形態にのみ限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、さまざまな形態で実施をすることができる。

なお、本明細書において引用した文献、および公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。

[0014] 1. 分泌型タンパク質

本発明において、分泌型タンパク質とは、細胞外に分泌されうるタンパク質をいい、細胞外に分泌されうるタンパク質であれば特に限定されない。分泌型タンパク質としては、例えば、ペプチド性ホルモン、サイトカイン、アルブミン(例えば、血清アルブミン等)、グロブリン(例えば、免疫グロブリン等)、酵素、その他の分泌型タンパク質などが挙げられる。

[0015] ペプチド性ホルモンとしては、例えば、ナトリウム利尿ペプチド、視床下部ホルモン(例えば、オピオイドペプチド、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、性腺刺激ホルモン、ソマトスタチン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン放出因子、色素胞刺激ホルモン放出因子、色素胞刺激ホルモン放出抑制因子、プロラクチン放出因子、プロラクチン放出抑制因子、ヘッドアクチベーター等)、脳下垂体ホルモン(例えば、副腎皮質刺激ホルモン、成長ホルモン、プロラクチン、甲状腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、卵胞刺激ホルモン、色素胞刺激ホルモン、オキシトシン、バソプレシン等)、甲状腺ホルモン(例えば、カルシトニン等)、副甲状腺ホルモン、膵臓ホルモン(例えば、インシュリン、グルカゴン、膵臓ポリペプチド等)、消化管ホルモン(セクレチン、パソアクチブインテスティナルポリペプチ

ド、ガストリックインヒビトリポリペプチド、ガストリン、ガストリン放出ペプチド、コレシストキニン、モチリン、セルレイン、ウロガストロン等)、唾液腺ホルモン、胎盤性ホルモン(例えば、じゅう毛性性腺刺激ホルモン、胎盤性ラクタゲン等)、卵巣ホルモン、成長因子(例えば、上皮細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、エリスロポエチン、血管内皮細胞増殖因子、インシュリン様成長因子、神経成長因子、骨形成促進因子、腫瘍増殖因子、肝細胞増殖因子、トランスフォーミング成長因子等)等が挙げられる。

[0016] サイトカインとしては、例えば、マクロファージ活性化因子、タフトシン、マクロファージ遊走因子、マクロファージ遊走阻止因子、胸腺ホルモン(例えば、チモシン、キラーT細胞活性化因子、サプレッサーT細胞誘導因子、T細胞DNA合成抑制物質等)、シクロスポリン、インターロイキン(例えば、インターロイキン1、インターロイキン2、インターロイキン3、インターロイキン4、インターロイキン5、インターロイキン6等)、コロニー刺激因子、ムラミルジペプチド、インターフェロン(例えば、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ 等)、腫瘍壊死因子、リンホトキシン等が挙げられる。

[0017] 酵素としては、例えば、タンパク分解酵素(例えば、セリンプロテアーゼ(例えば、トリプシン、カリクレイン、ウロキナーゼ、プラスミン等)、チオールプロテアーゼ、カルボキシプロテアーゼ、金属プロテアーゼ等)、血液凝固因子(例えば、血液凝固因子I、血液凝固因子II、血液凝固因子III、血液凝固因子VII、血液凝固因子VIII、血液凝固因子IX、血液凝固因子X、血液凝固因子XI、血液凝固因子XII、血液凝固因子XIII等)、プラスミノゲン活性化因子、酸化還元酵素(例えば、スーパーオキシドジスムターゼ等)、転移酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、リン酸化酵素(例えば、チロシンキナーゼ、セリンスレオニンキナーゼ等)、脱リン酸化酵素(例えば、肝臓由来アルカリフォスファターゼ、骨由来アルカリフォスファターゼ、胎盤由来アルカリフォスファターゼ等)、脱炭酸酵素等が挙げられる。

[0018] その他の分泌型タンパク質としては、例えば、prostate-specific antigen、apolipoprotein A-I等が挙げられる。

[0019] また、分泌型タンパク質には、他のペプチドが付加された融合タンパク質も含まれる

。分泌型タンパク質に付加するペプチドとしては、インフルエンザ凝集素(HA)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、サブスタンスP、多重ヒスチジンタグ(6×His、10×His等)、プロテインC断片、マルトース結合タンパク質(MBP)、免疫グロブリン定常領域断片、 α -チューブリン断片、 β -ガラクトシダーゼ、B-タグ、c-myc断片、E-タグ(モノクローナルファージ上のエピトープ)、FLAG(Hopp et al. (1988) Bio/Technol. 6: 1204-10)、lckタグ、p18 HIV断片、HSV-タグ(ヒト単純ヘルペスウイルス糖タンパク質)、SV40T抗原断片、T7-タグ(T7 gene10タンパク質)、VSV-GP断片(Vesicular stomatitisウイルス糖タンパク質)等のタンパク質またはペプチドの全長または一部を含有する、タンパク質の識別を容易にする配列またはタンパク質を発現させる際に安定性を付与する配列等を含有するペプチドを選択することができる。

[0020] また、分泌型タンパク質は、人工的に分泌されるように改変したものも含まれる。人工的に分泌されるように改変するためには、膜結合部分ペプチドを欠失させる、分泌シグナルとして知られている配列を含有するペプチド(例えば、シグナルペプチド等)を結合する等の方法によって、行うことができる。

人工的に分泌されるように改変された、特に好ましい分泌型タンパク質として、後述する分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼが挙げられる。

[0021] 後述の分泌型タンパク質発現ベクターから転写され翻訳された分泌型タンパク質(以下、「本発明の分泌型タンパク質」と称する場合がある)は、後述の非ヒト動物における内在性の分泌型タンパク質と区別できるものであることが望ましい。内在性の分泌型タンパク質と区別できる本発明の分泌型タンパク質としては、例えば、後述の非ヒト動物と異なる動物種由来の配列を有する分泌型タンパク質、変異型のアミノ酸配列を有する分泌型タンパク質、他のペプチドが付加された融合タンパク質などが挙げられる。

これらの分泌型タンパク質は、本発明の分泌型タンパク質を認識し、かつ、内在性のタンパク質を認識しない抗体を用いることにより、本発明の分泌型タンパク質を内在性のタンパク質と区別することができる。また、これらの分泌型タンパク質は、本発明の分泌型タンパク質を分解および／または失活させないが、内在性のタンパク質を分解および／または失活させる条件下で処理する方法により、本発明の分泌型タ

ンパク質を内在性のタンパク質と区別することができる。内在性のタンパク質を分解および／または失活させる条件としては、例えば、熱処理、酵素処理などが挙げられる。

[0022] 2. 分泌型タンパク質発現ベクター

本発明において、分泌型タンパク質発現ベクターとは、分泌型タンパク質を発現できるベクターをいい、分泌型タンパク質を発現できるベクターであれば特に限定されない。

分泌型タンパク質発現ベクターとしては、ベクターに転写制御配列を含むポリヌクレオチドおよび分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを連結したものが好ましい。さらに好ましい態様においては転写制御配列下に分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを結合したもの、すなわち、転写制御配列及びそれに機能的に結合された分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが挙げられる。

[0023] 分泌型タンパク質発現ベクターを作成する為に用いるベクターは、分泌型タンパク質を発現させるように設計することができるベクターであれば、その種類は限定されない。例えば、分泌型タンパク質発現ベクターを作成する為に用いるベクターには、プラスミドベクター、コスミドベクター、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス等由来のベクター）、バクテリオファージベクターなどが挙げられる。また、クローニング用ベクター、発現ベクター等の種々のベクターが含まれる (Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987))。

[0024] 本発明において、転写制御配列とは、転写開始活性を持った核酸配列のことである。転写制御配列には、転写制御因子結合配列を有しないプロモーター、転写制御因子結合配列を有するプロモーターなどがあげられる。

[0025] プロモーターとしては、アデノウイルスlateプロモーター(Kaufman et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 946)、CAGプロモーター(Niwa et al. (1991) Gene 108: 193-200)、CMV immediate earlyプロモーター(Seed and Aruffo (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3365-9)、EF1 α プロモーター(Mizushima et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18:

5322; Kim et al. (1990) Gene 91: 217-23)、HSV TKプロモーター、SR α プロモーター(Takebe et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 466)、SV40プロモーター(Mulligan et al. (1979) Nature 277: 108)、SV40 earlyプロモーター(Genetic Engineering Vol.3, Williamson ed., Academic Press (1982) pp.83-141)、SV40 lateプロモーター(Gheysen and Fiers (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1: 385-94)、RSV(ラウス肉腫ウイルス)-LTRプロモーター(Cullen (1987) Methods Enzymol. 152: 684-704)、MMLV-LTRプロモーター等を使用することができる。プロモーターの核酸配列が公知であれば、同一の核酸配列からなるポリヌクレオチドを得ることは当業者にとって容易である。

[0026] ここで、「ポリヌクレオチド」とは、複数のデオキシリボ核酸 (DNA) またはリボ核酸 (RNA)等の塩基または塩基対からなる重合体を指し、DNA、cDNA、ゲノムDNA、化学合成DNA及びRNAを含む。また、天然以外の塩基を必要に応じて含むポリヌクレオチドも包含する。

[0027] 転写制御因子結合配列とは、転写制御因子が結合する配列をいい、例えば、エンハンサー、サプレッサー、上流調節配列 (Upstream Regulatory Sequence) などが挙げられる。

転写制御因子結合配列としては、例えば、低酸素応答配列 (以下、「HRE」と称する場合がある、Kimura, et. al. (2001) The Journal of Biological Chemistry, 276: 2292-2298)、IL4 responsible element (以下、「IL4RE」と称する場合がある、Richard Moriggl, et. al. (1997) Molecular and cellular Biology, vol17:3663-3678)、E2F結合塩基配列 (Ginsberg, et. al. (1994) Genes & development, 8(22): 2665-2679)、エストロゲン受容体結合配列 (Fawell, et. al. (1990) Cell, 60(6): 953-962)、GATA-1結合塩基配列 (Orkin (1990) Cell, 63(4): 665-72)、AP1結合塩基配列 (Wasylyk, et. al. (1989) Molecular and cellular biology, 9(5): 2247-2250)、p53結合塩基配列 (Levine, et. al. (1991) Nature, 351(6326): 453-6) またはその他の転写因子結合配列 (Steffen, et. al. (1992) Nucleic Acids Research, 20(1): 3-26) などを使用することができる。

HREとしては、例えば、配列番号:1で表される配列、配列番号:2で表される配列、配列番号:3で表される配列、配列番号:4で表される配列などがあげられ、好ましく

は、配列番号:1で表される配列があげられる。

IL4REとしては、例えば、配列番号:5で表される配列、配列番号:6で表される配列、配列番号:7で表される配列、配列番号:8で表される配列などがあげられ (Martin Seidel, et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol92:3041-3045)、好ましくは、配列番号:8で表される配列が挙げられる。

[0028] これらの転写制御因子結合配列を含むポリヌクレオチドは、当該転写制御因子結合配列の核酸配列を基に容易に得ることができる。より具体的な例としては、転写制御因子結合配列と同一の配列および当該配列に相補的な配列を有する一本鎖ポリヌクレオチドをそれぞれ化学合成し、両ポリヌクレオチドを混合し、次に、例えば、95℃で2分から10分加熱した後に、37℃1時間、室温1時間で冷却することによって、所望の転写制御因子結合配列の核酸配列を含む二本鎖ポリヌクレオチドを得ることができる。

[0029] また、分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、当該分泌型タンパク質をコードする核酸配列を基にプライマーを設計し、遺伝子増幅技術 (PCR) (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 6.1-6.4)により、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物、好ましくはヒトのcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーから得ることができる。

[0030] cDNAライブラリーの作成方法については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))を参照することができる。また、市販のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーを用いてもよい。

[0031] より具体的に、cDNAライブラリーの作製においては、まず、分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを発現する細胞、臓器、組織等 (例えば、胎盤) からグアニジン超遠心法 (Chirwin et al. (1979) Biochemistry 18: 5294-9)、AGPC法 (Chomczynski and Sacchi (1987) Anal. Biochem. 162: 156-9) 等の公知の手法により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia) 等を用いてmRNAを精製する。Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia) のような、直接mRNAを調製するためのキットを利用してもよい。次に得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業) のような

cDNA合成のためのキットも市販されている。その他の方法として、cDNAはPCRを利用した5'-RACE法 (Frohman et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9002; Belyavsky et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 2919-32) により合成、及び増幅させてもよい。また、全長率の高いcDNAライブラリーを作製するために、オリゴキャップ法 (Maruyama and Sugano (1994) Gene 138: 171-4; Suzuki (1997) Gene 200: 149-56) 等の公知の手法を採用することもできる。上述のようにして得られたcDNAは、適当なベクター中に組み込むことができる。

- [0032] 分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドの核酸配列の確認は、慣用の方法により配列決定することにより行うことができる。例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法(Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463) 等により行うことができる。また、適当なDNAシーケンサーを利用して配列を解析することも可能である。
- [0033] ベクターへの転写制御配列を含むポリヌクレオチドおよび分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドなどの挿入は、リガーゼ反応により行うことができる。このとき、制限酵素サイトを利用することもできる(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11; Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989) Section 5.61-5.63)。
- [0034] また、分泌型タンパク質発現ベクターは、分泌型タンパク質発現ベクターを導入した宿主細胞内で選択可能なマーカー遺伝子を含んでいてもよい。選択可能なマーカー遺伝子としては、例えば、薬剤耐性遺伝子(ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子等)や蛍光タンパク質(GFP、EGFP等)をコードするポリペプチドなどが挙げられる。
- [0035] さらに、分泌型タンパク質発現ベクターは、好ましくは当該ベクターを大腸菌内で増幅するためのori、及び形質転換された宿主を選抜するためのマーカー遺伝子を持つことができる。アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、及びクロラムフェニコール等の薬剤により宿主の判別を行うことを可能にする薬剤耐性遺伝子の使用が好ましい。
- [0036] 分泌型タンパク質発現ベクターは、好ましくは後述する本発明のPLAPベクターが

挙げられる。

[0037] 3. 分泌型タンパク質発現ベクターが導入された細胞

分泌型タンパク質発現ベクターが導入された細胞(本明細書において、「分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞」と称する場合がある)の作製は、常法により上述の分泌型タンパク質発現ベクターを細胞にトランスフェクションすることにより行うことができる。

以下に、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞の作製方法について詳細に説明する。

[0038] 分泌型タンパク質発現ベクターを導入する細胞は、動物に移植可能なものであれば何でもよく、その種類は限定されない。好ましくは、哺乳動物由来の真核細胞(例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓 β 細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞、不死化細胞もしくは腫瘍細胞など)が挙げられ、特に好ましくは不死化細胞又は腫瘍細胞が挙げられる

[0039] 宿主細胞への分泌型タンパク質発現ベクターの導入は、エレクトポレーション法(Chu et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15: 1311-26)、カチオニックリポソーム法、電気パルス穿孔法(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 9.1-9.9)、微小ガラス管を使用した直接注入法、マイクロインジェクション法、リポフェクション(Derijard (1994) Cell 7: 1025-37; Lamb (1993) Nature Genetics 5: 22-30; Rabindran et al. (1993) Science 259: 230-4)、リポフェクタミン法(GIBCO-BRL)、リン酸カルシウム法(Chen and Okayama (1987) Mol. Cell. Biol. 7: 2745-52)、DEAEデキストラン法(Lopata et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12: 5707-17; Sussman and Milman (1985) Mol. Cell. Biol. 4: 1642-3)、FuGene6試薬(Boehringer-Mannheim)等により行うことができる。

[0040] 宿主細胞の培養は、選択した細胞に適した公知の方法により行うことができる。例

えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM、F12等の培地を用い、必要に応じウシ胎児血清(FCS)等の血清、アミノ酸、グルコース、ペニシリン又はストレプトマイシンなどを添加することができ、pH約6〜8、30〜40℃において15〜200時間前後の培養を行うことができる。その他、必要に応じ途中で培地の交換を行ったり、通気及び攪拌を行ったりすることができる。

[0041] 分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞は、そのまま用いることも可能であるが、培養中に性質が偏ることを避けるため、および／または、分泌型タンパク質がより多く発現している細胞を取得し安定した評価を可能とするためにクローニングを行うことができる。細胞のクローニングは、常法(例えば、限外希釈法、フローサイトメトリーによるセルソーティング等)により行うことができる。クローニング後の細胞株から、細胞外に分泌された当該分泌型タンパク質の量(以下、「分泌タンパク質量」と称する場合がある)の測定、分子生物学的手法(例えば、定量的RT-PCR法、ノーザンブロッティングなど)による分泌型タンパク質mRNAコピー数の解析等により最適な本発明の分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞株を選別することができる。

[0042] 分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞は、好ましくは後述する本発明のPLAPベクター導入細胞が挙げられる。

[0043] 4. 分泌タンパク質量の測定方法

分泌型タンパク質を含む試料に含まれる分泌タンパク質量は、既存の方法により測定できる。ここで、分泌型タンパク質を含む試料としては、分泌型タンパク質を含む試料であれば特に限定なく用いることができるが、後述の生体液、例えば、血液、血漿、血清、尿、脳脊髄液など、より好ましくは血液、血漿又は血清、特に好ましくは血漿で用いることができる。

[0044] 分泌タンパク質量の測定方法は、特に限定されず、例えば、免疫学的手法(例えば、ELISA、RIA、EIA、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット等)、クロマトグラフィー、マススペクトロメトリー、酵素活性等により測定することができる。例えば、ELISA法により測定する場合、分泌型タンパク質に対する抗体(一次抗体)をプレート等の担体に固相化し、次いで、分泌型タンパク質を含む試料を添加し、インキュベーションを行う。続いて、分泌型タンパク質を認識する抗体を認識する二次抗体を添加し、プレート

のインキュベーションを行う。その後、プレートを洗浄し、二次抗体に付加された標識を検出する。このようにして分泌タンパク質量を測定することができる。測定に用いられる一次抗体および二次抗体は、市販のものを用いてもよく、既知の方法によって作製してもよい。また、あらかじめ分泌型タンパク質に、インフルエンザ凝集素(HA)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、サブスタンスP、多重ヒスチジンタグ(6×His、10×His等)、プロテインC断片、マルトース結合タンパク質(MBP)、免疫グロブリン定常領域断片、 α -チューブリン断片、 β -ガラクトシダーゼ、B-タグ、c-myc断片、E-タグ(モノクローナルファージ上のエピトープ)、FLAG(Hopp et al. (1988) Bio/Technol. 6: 1204-10)、lckタグ、p18 HIV断片、HSV-タグ(ヒト単純ヘルペスウイルス糖タンパク質)、SV40T抗原断片、T7-タグ(T7 gene10タンパク質)、VSV-GP断片(Vesicular stomatitisウイルス糖タンパク質)等のタンパク質の識別を容易にする配列からなるペプチドの全部または一部を含有するペプチドを付加している場合には、一次抗体としてこれらのペプチドを認識する抗体を用いることができる。

[0045] また、分泌型タンパク質が酵素である場合には、当該酵素活性を測定することにより、分泌タンパク質量を算出することができる。酵素活性を測定することで分泌タンパク質量を定量することができることは、当業者であれば容易に理解できる。本発明において、分泌タンパク質量を測定することには、酵素活性を測定することも含むものとする。

[0046] 酵素活性の測定は、例えば、以下のように行うことができる。分泌型タンパク質を含む試料および基質溶液を混合し、インキュベーションを行う。続いて、酵素反応により生成した生成物の量または添加した基質の量を測定する。このようにして酵素活性を測定することができ、また、酵素活性をもとに分泌タンパク質量を測定することができる。

基質および生成物の量は、例えば、吸光度、蛍光強度、化学発光強度などを指標として測定することができる。ここで、吸光度、蛍光強度、化学発光強度などは、基質または生成物に由来するものであっても、基質または生成物を認識する抗体に付加された標識に由来するものであってもよい。

[0047] 分泌型タンパク質を含む試料に含まれる分泌タンパク質量は、後述の非ヒト動物に

における内在性の分泌型タンパク質と区別して測定することが望ましい。本発明の分泌型タンパク質を内在性の分泌型タンパク質と区別する方法としては、例えば、後述の非ヒト動物と異なる動物種由来の配列を有する分泌型タンパク質を用いる方法、変異型のアミノ酸配列を有する分泌型タンパク質を用いる方法、他のペプチドが付加された融合タンパク質を用いる方法などが挙げられる。

これらの方法において、本発明の分泌型タンパク質を認識し、かつ、内在性のタンパク質を認識しない抗体を用いた免疫学的手法により、本発明の分泌型タンパク質を内在性のタンパク質と区別して測定することができる。また、本発明の分泌型タンパク質を分解および／または失活させないが、内在性のタンパク質を分解および／または失活させる条件下で処理することにより、本発明の分泌型タンパク質を内在性のタンパク質と区別して測定することができる。内在性のタンパク質を分解および／または失活させる条件としては、例えば、熱処理、酵素処理などが挙げられる。

[0048] 5. 非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法

分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルにおいて、生体液中の当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標とすることによって、非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写制御配列を介した転写活性を測定することができる。

[0049] 以下、より詳細に記載する。

分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞は、前述のように得ることができ、培養することができる。また、移植する細胞は、*in vivo*で培養されたものであってもよい(Asano et al, Jpn J Cancer Res. 1999 Jan;90(1):93-100)。

[0050] 分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を、非ヒト動物に移植する。移植される非ヒト動物は、特に限定されず、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、イヌ、サル、ニワトリ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ネコなどがあげられ、好ましくはマウスおよびラット、特に好ましくはマウスである。また、非ヒト動物への移植部位は、特に限定されず、例えば、皮下、腹腔内、血中、臓器(例えば、脳、脳の各部位(例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂

体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など)があげられる。

[0051] 移植する細胞数は、特に限定されず、例えば、 10^2 から 10^9 cells/head、好ましくは 10^4 から 10^8 cells/head、より好ましくは 10^5 から 10^7 cells/head、特に好ましくは 5×10^5 から 5×10^6 cells/headである。

[0052] 移植に際しては、細胞をそのまま移植しても良いし、細胞以外に薬学的に許容される担体を含んだものを移植してもよい。担体としては、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液、血清、生体液およびカルボキシメチルセルロース液などが挙げられる。また、細胞の足場となる固体(例えば、cytodex3 (Amersham Bioscience, 17-0485-01)等)、細胞外基質成分(例えば、コラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、ヘパラン硫酸、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン、エラスチンまたはこれら2種以上の組み合わせ等)またはゲル状の支持体などと組み合わせて移植してもよい。

また、移植に際しては、血管新生因子(例えば、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、酸性線維芽細胞増殖因子(aFGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β)、アンジオポエチン(angiotensin)、肝細胞増殖因子(HGF)等)を含んだものを移植してもよい。

[0053] 移植後、適当な期間(例えば、1時間から1095日、好ましくは2時間から365日、より好ましくは24時間から180日など)飼育し、生体液を採取する。生体液は、当該非ヒト動物由来のものであれば、その種類は限定されないが、例えば、血液、血漿、血清、尿、脳脊髄液など、好ましくは血液、血漿又は血清、より好ましくは血漿または血清、特に好ましくは血漿である。

採取した生体液は、必要に応じて当該分泌型タンパク質を含む画分と含まない画分を分離することができる。血液の場合には、遠心によって、血漿を分離し、血漿を生体液として用いることが望ましい。分離した生体液は、分泌タンパク質量を測定するまで、適当な温度、好ましくは 4°C 以下、特に好ましくは -20°C 以下で保存すること

ができる。

生体液中の分泌タンパク質量は、上述の分泌タンパク質量の測定方法により測定することができる。

[0054] ここで、当該分泌型タンパク質は、分泌型タンパク質発現ベクターから転写され、当該分泌型タンパク質に翻訳されて生体液中に分泌されたタンパク質である。よって、上記方法によって得られた分泌タンパク質量は、分泌型タンパク質発現ベクターにおける転写制御配列を介した転写活性に依存して変化するものであり、当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標とすることによって、分泌型タンパク質発現ベクターに挿入した転写制御配列を介した転写活性を測定することができる。

[0055] 6. 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法

分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルに被検化合物を投与し、生体液中の分泌タンパク質量を測定し、分泌タンパク質量を変化させる化合物を選択することによって、非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングすることができる。

また、被検化合物を投与された非ヒト動物に分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルにおいて、生体液中の分泌タンパク質量を測定し、分泌タンパク質量を変化させる化合物を選択することによって、非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングすることができる。

[0056] 以下、より詳細に記載する。

非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法においては、分泌型タンパク質発現ベクターには、転写制御因子結合配列を有するポリヌクレオチドを含んでいることが好ましい。転写制御因子結合配列は、特に限定されず、例えば、HRE、IL4RE、E2F結合塩基配列、エストロゲン受容体結合配列、GATA-1結合塩基配列、AP1結合塩基配列、p53結合塩基配列またはその他の

転写因子結合配列を使用することができ、好ましくは、HRE又はIL4REである。

HREとしては、例えば、配列番号:1で表される配列、配列番号:2で表される配列、配列番号:3で表される配列、配列番号:4で表される配列などがあげられ、好ましくは、配列番号:1で表される配列があげられる。

IL4REとしては、例えば、配列番号:5で表される配列、配列番号:6で表される配列、配列番号:7で表される配列、配列番号:8で表される配列などがあげられ (Martin Seidel, et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol92:3041-3045)、好ましくは、配列番号:8で表される配列が挙げられる。

[0057] 前述の方法で、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物モデルに移植し、非ヒト動物モデルを作製することができる。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与方法は、特に限定されず、例えば、経口投与、静脈投与、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与、頭蓋内投与等があげられる。また、対照群として無投与、ビークル投与等を設定することができる。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与量は、特に限定されず、例えば、1ng/kgから1g/kg、好ましくは100ng/kgから1g/kg、より好ましくは1mg/kgから1g/kg、特に好ましくは10mg/kgから300mg/kgである。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与時期は、特に限定されず、例えば、細胞移植前、細胞移植時、細胞移植後などである。

[0058] 生体液中の分泌タンパク質量の測定は、前述の方法で行うことができる。

化合物を投与した非ヒト動物モデルの生体液中の分泌タンパク質量を、対照群の生体液中の分泌タンパク質量と比較することにより、転写活性に影響を与える化合物のスクリーニングを行うことができる。

当該スクリーニング方法においては、例えば、化合物を投与された非ヒト動物モデルの生体液中の分泌タンパク質量が、対照群の生体液中の分泌タンパク質量に比べ、1.2倍以上、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは2.0倍以上、特に好ましくは3.0倍以上増加または減少した場合に、転写活性に影響を与えると判断することができる。

[0059] 本発明において、被検化合物には、ペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、ポリヌクレオチド、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物

組織抽出液、血漿などが含まれる。ポリヌクレオチドには、例えば、アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイムヌクレオチド、double strand RNAなどが含まれる。ここで、double strand RNAとは、RNA干渉 (Fire, et. al. (1998) Nature, 391:806-811) を引き起こす二本鎖RNAをいう。

[0060] 7. 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積を測定する方法

分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルにおいて、生体液中の当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標とすることによって、非ヒト動物モデルにおける移植細胞数を測定することができる。

また、分泌型タンパク質発現ベクターを導入した細胞を非ヒト動物に移植することにより、非ヒト動物に腫瘍を惹起させ、当該腫瘍において分泌型タンパク質を産生させることができる。この場合、当該非ヒト動物モデルにおいて、生体液中の当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標にすることにより、腫瘍体積を測定することができる。

[0061] 以下、より詳細に記載する。

非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積を測定する方法においては、分泌型タンパク質発現ベクターには、恒常的転写制御配列からなるポリヌクレオチドを含んでいることが好ましい。ここで、恒常的転写制御配列とは、恒常的に (constitutively) 転写開始活性を有している配列をいう。恒常的転写制御配列は、恒常的に転写開始活性を有している配列であれば特に限定されず、例えば、SV40プロモーター、CMVプロモーター、チミジンキナーゼプロモーター、Ubiquitin Cプロモーター、Elongation factor 1 alpha (EF1a) プロモーター、 β -actinプロモーター、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase プロモーター、Phosphoglycerokinaseプロモーター、 β 2-Microglobulinプロモーター、 β -Glucuronidaseプロモーター等を使用することができる。SV40プロモーターとしては、例えば、配列番号:9で表される配列があげられる。

前述の方法で、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、生

体液中の分泌タンパク質量の測定を行うことができる。

- [0062] ここで、恒常的転写制御配列による転写活性は、常に一定の活性を示すと考えられるため、移植細胞数に依存した量の分泌型タンパク質が生体液中に分泌される。よって、上記方法によって得られた分泌タンパク質量は、非ヒト動物モデルにおける移植細胞数に依存して変化するものであり、当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標とすることで、移植細胞数を測定することができる。

また、本発明において、「移植細胞数」とは、非ヒト動物に人為的に移植された細胞由来の細胞数をいい、非ヒト動物中において増加または減少した後の細胞数をも含む概念である。

- [0063] したがって、飼育する前および適当な期間飼育した後での生体液中の分泌タンパク質量を比較することにより、非ヒト動物モデルにおいて、移植した細胞数の増減を測定することができる。また、固形腫瘍においては、細胞数は腫瘍体積と相関すると考えられるため、非ヒト動物に固形腫瘍を惹起させた場合は、腫瘍体積の増減をも測定することができる。

- [0064] 8. 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法

分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルに化合物を投与し、生体液中の当該分泌タンパク質量を測定し、分泌タンパク質量を変化させる化合物を選択することによって、非ヒト動物モデルにおいて、移植細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングすることができる。

また、化合物を投与された非ヒト動物に分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルにおいて、生体液中の当該分泌タンパク質量を測定し、分泌タンパク質量を変化させる化合物を選択することによって、非ヒト動物モデルにおいて、移植細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングすることができる。

さらに、分泌型タンパク質発現ベクターを導入した細胞を非ヒト動物に移植することにより、非ヒト動物に腫瘍を惹起させ、当該腫瘍において分泌型タンパク質を産生さ

せることができる。この場合、当該非ヒト動物モデルに化合物を投与し、生体液中の当該分泌タンパク質量を測定し、分泌タンパク質量を変化させる化合物を選択することによって、非ヒト動物モデルにおいて、腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングすることができる。

[0065] 以下、より詳細に記載する。

非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法においては、分泌型タンパク質発現ベクターには、恒常的転写制御配列からなるポリヌクレオチドを含んでいることが好ましい。ここで、恒常的転写制御配列とは、恒常的に転写開始活性を有している配列をいう。恒常的転写制御配列は、恒常的に転写開始活性を有している配列であれば特に限定されず、例えば、SV40プロモーター、CMVプロモーター、チミジンキナーゼプロモーター、Ubiquitin Cプロモーター、Elongation factor 1 alpha (EF1a) プロモーター、 β -actinプロモーター、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase プロモーター、Phosphoglycerokinaseプロモーター、 β 2-Microglobulinプロモーター、 β -Glucuronidaseプロモーター等を使用することができる。SV40プロモーターとしては、例えば、配列番号:9で表される配列があげられる。

[0066] 前述の方法で、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を移植し、非ヒト動物モデルを作製することができる。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与方法は、特に限定されず、例えば、経口投与、静脈投与、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与、頭蓋内投与等があげられる。また、対照群として無投与、ビークル投与等を設定することができる。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与量は、特に限定されず、例えば、1ng/kgから1g/kg、好ましくは100ng/kgから1g/kg、より好ましくは1mg/kgから1g/kg、特に好ましくは10mg/kgから300mg/kgである。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与時期は、特に限定されず、例えば、細胞移植前、細胞移植時、細胞移植後などである。

生体液中の分泌タンパク質量の測定は、前述の方法で行うことができる。

[0067] 化合物を投与された非ヒト動物モデルの生体液中の分泌タンパク質量を、対照群

の生体液中の分泌タンパク質量と比較することにより、移植細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングすることができる。また、固形腫瘍においては、細胞数は腫瘍体積と相関すると考えられるため、腫瘍体積に影響を与える化合物をもスクリーニングすることができる。当該スクリーニング方法においては、例えば、化合物を投与された非ヒト動物モデルの生体液中の分泌タンパク質量が、対照群の生体液中の分泌タンパク質量に比べ、1.2倍以上、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは2.0倍以上、特に好ましくは3.0倍以上増加または減少した場合に、移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与えると判断することができる。

[0068] 9. 測定キット

分泌型タンパク質発現ベクターを含有する測定キットは、(1)非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法(前記「5. 非ヒト動物における移植細胞中の転写活性の測定方法」を示す)、(2)非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「6. 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)、(3)非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積を測定する方法(前記「7. 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積を測定する方法」を示す)および(4)非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「8. 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)に用いるものであり、分泌型タンパク質発現ベクターを含んでいればよく、その他の組成は限定されない。

当該測定キットに含有されるものとしては、例えば、コントロールベクター、トランスフェクション試薬、細胞培養液、測定用抗分泌型タンパク質抗体、測定用緩衝液などが挙げられる。

[0069] 分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を含有する測定キットは、(1)非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法(前記「5. 非ヒト動物における移植細胞中の転写活性の測定方法」を示す)、(2)非ヒト動物モデルにおいて、転写活性

に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「6. 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)、(3) 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積を測定する方法(前記「7. 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積を測定する方法」を示す)および(4) 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「8. 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)に用いるものであり、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を含んでいけばよく、その他の組成は限定されない。

当該測定キットに含有されるものとしては、例えば、コントロール細胞、細胞培養液、測定用抗分泌型タンパク質抗体、測定用緩衝液などが挙げられる。

[0070] 分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を移植した非ヒト動物を含有する測定キットは、(1) 非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法(前記「5. 非ヒト動物における移植細胞中の転写活性の測定方法」を示す)、(2) 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「6. 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)、(3) 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積を測定する方法(前記「7. 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積を測定する方法」を示す)および(4) 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「8. 非ヒト動物モデルにおいて、分泌タンパク質量を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)に用いるものであり、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を移植した非ヒト動物を含んでいけばよく、その他の組成は限定されない。

当該測定キットに含有されるものとしては、例えば、コントロール非ヒト動物、測定用

抗分泌型タンパク質抗体、測定用緩衝液などが挙げられる。

[0071] 10. 本発明のPLAP

本発明において、分泌型タンパク質は、好ましくは分泌型の酵素であり、より好ましくは分泌型アルカリフォスファターゼであり、特に好ましくは分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼである。また、分泌型アルカリフォスファターゼは、より好ましくは耐熱性の分泌型アルカリフォスファターゼである。ここで、耐熱性とは、40℃以上、好ましくは45℃以上、より好ましくは50℃以上、より好ましくは55℃以上、より好ましくは60℃以上、特に好ましくは65℃以上において、5分以上、好ましくは10分以上、より好ましくは20分以上の熱処理によっても酵素活性が失われないことをいう。

以下、分泌型タンパク質として、分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼを用いた場合について詳細に説明する。

[0072] 本発明において、胎盤由来アルカリフォスファターゼ(以下、「PLAP」と称することがある)とは、胎盤に由来し、アルカリフォスファターゼとしての酵素活性を有するポリペプチドをいい、例えば、GenBankアクセッション番号M13077で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドを含むものであり、好ましくはGenBankアクセッション番号M13077で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである。アルカリフォスファターゼの酵素活性の測定方法は、特に限定されず、例えば、後述のPLAP活性の測定方法によって測定することができる。

また、分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼ(以下、「本発明のPLAP」と称することがある)とは、アルカリフォスファターゼの酵素活性を有し、かつ、細胞外に分泌されるように改変されたポリペプチドをいい、配列番号:11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドが好ましく、配列番号:11で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドがより好ましい。また、配列番号:11で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、好ましくは配列番号:11で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドを用いることもできる。

[0073] 以下、本発明のPLAPについて詳細に説明する。

配列番号:11で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号:13で表されるアミノ酸配列または配列番号:15で表されるアミノ酸配

列が挙げられる。

- [0074] また、配列番号:11で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号:11で表されるアミノ酸配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

特に、配列番号:11で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、上記のアミノ酸配列のほか、配列番号:11で表わされるアミノ酸配列において1個又は複数個(例えば1個又は数個)のアミノ酸に欠失、置換又は付加等の変異が生じたアミノ酸配列であって、アルカリフォスファターゼの酵素活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列があげられる。

例えば、(i) 配列番号:11で表されるアミノ酸配列中の1〜5個(好ましくは1〜3個、さらに好ましくは1〜2個、より好ましくは1個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号:11で表されるアミノ酸配列に1〜5個(好ましくは1〜3個、さらに好ましくは1〜2個、より好ましくは1個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号:11で表されるアミノ酸配列に1〜5個(好ましくは1〜3個、さらに好ましくは1〜2個、より好ましくは1個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号:11で表されるアミノ酸配列中の1〜5個(好ましくは1〜3個、さらに好ましくは1〜2個、より好ましくは1個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、(v) 上記(i)〜(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

- [0075] 1又は複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなる変異ポリペプチドであって、元のポリペプチドと同じ生物学的活性が維持されるポリペプチドも、本発明の範囲に含まれる (Mark et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-6; Zoller and Smith (1982) Nucleic Acids Res. 10: 6487-500; Wang et al. (1984) Science 224: 1431-3; Dalbadie-McFarland et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6409-13)。

- [0076] ここで、アミノ酸の置換とは、配列中のアミノ酸残基の一つ以上が、異なる種類のアミノ酸残基に変えられた変異を意味する。このような置換により本発明のPLAPのアミノ酸配列を改変する場合、タンパク質の機能を保持するためには、保存的な置換を行うことが好ましい。保存的な置換とは、置換前のアミノ酸と似た性質のアミノ酸をコ

ードするように配列を変化させることである。アミノ酸の性質は、例えば、非極性アミノ酸(Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val)、非荷電性アミノ酸(Asn, Cys, Gln, Gly, Ser, Thr, Tyr)、酸性アミノ酸(Asp, Glu)、塩基性アミノ酸(Arg, His, Lys)、中性アミノ酸(Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val)、脂肪族アミノ酸(Ala, Gly)、分枝アミノ酸(Ile, Leu, Val)、ヒドロキシアミノ酸(Ser, Thr)、アミド型アミノ酸(Gln, Asn)、含硫アミノ酸(Cys, Met)、芳香族アミノ酸(His, Phe, Trp, Tyr)、複素環式アミノ酸(His, Trp)、イミノ酸(Pro, 4Hyp)等に分類することができる。

従って、非極性アミノ酸同士、あるいは非荷電性アミノ酸同士で置換させることが好ましい。中でも、Ala、Val、Leu及びIleの間、Ser及びThrの間、Asp及びGluの間、Asn及びGlnの間、Lys及びArgの間、Phe及びTyrの間の置換は、タンパク質の性質を保持する置換として好ましい。変異されるアミノ酸の数及び部位は特に制限ない。

[0077] 本発明のPLAPには、他のペプチドが付加された融合タンパク質も含まれる。本発明のPLAPに付加するペプチドとしては、インフルエンザ凝集素(HA)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、サブスタンスP、多重ヒスチジンタグ(6×His、10×His等)、プロテインC断片、マルトース結合タンパク質(MBP)、免疫グロブリン定常領域断片、 α -チューブリン断片、 β -ガラクトシダーゼ、B-タグ、c-myc断片、E-タグ(モノクローナルファージ上のエピトープ)、FLAG(Hopp et al. (1988) Bio/Tech. 6: 1204-10)、lckタグ、p18 HIV断片、HSV-タグ(ヒト単純ヘルペスウイルス糖タンパク質)、SV40T抗原断片、T7-タグ(T7 gene10タンパク質)、VSV-GP断片(Vesicular stomatitisウイルス糖タンパク質)等のタンパク質またはペプチドの全長または一部を含有する、タンパク質の識別を容易にする配列またはタンパク質を発現させる際に安定性を付与する配列等を含有するペプチドを選択することができる。

[0078] 本発明のPLAPとしては、以上のようなポリペプチドがあげられ、例えば、前記の配列番号:11で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号:11で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドと実質的に同質のPLAP活性を有し、かつ、細胞外に分泌されるようなポリペプチドなどが好ましい。ここで、「PLAP活性」とは、PLAPにおけるアルカリフォスファターゼの酵素活性を意味する。実質的に同質の活性とは、その活性が性質的に(例、生理化学的に、または薬理的に)同質で

あることを示す。例えば、単位タンパク質量あたりのPLAP活性が、配列番号:11で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが有するPLAP活性と比較して、例えば、1%以上、好ましくは3%以上、より好ましくは10%以上、より好ましくは30%以上のPLAP活性を有する場合に実質的に同質の活性を有するということができる。PLAP活性の具体的な測定方法については後述する。

[0079] 11. 本発明のPLAPベクター

本発明において、分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼ発現ベクター(以下、「本発明のPLAPベクター」と称する場合がある)とは、本発明のPLAPを発現させることができるベクターをいい、本発明のPLAPを発現させることができるベクターであれば特に限定されない。

[0080] 本発明のPLAPベクターとしては、ベクターに転写制御配列を含むポリヌクレオチドおよび本発明のPLAPをコードするポリヌクレオチドを連結したものが好ましい。さらに好ましい態様においては転写制御配列下に本発明のPLAPをコードするポリヌクレオチドを結合したもの、すなわち、転写制御配列及びそれに機能的に結合された本発明のPLAPをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが挙げられる。

[0081] 本発明のPLAPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号:10で表される核酸配列と同一もしくは実質的に同一の核酸配列を含有するポリヌクレオチドを含むものである。実質的に同一の核酸配列を含有するポリヌクレオチドとしては、前記本発明のPLAPをコードする核酸配列を含有するポリヌクレオチドであれば限定されない。例えば、配列番号:11で表わされるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド(配列番号:10で表される核酸配列に加えて、遺伝子暗号の縮重により配列番号:10で表される核酸配列とは異なる核酸配列を含む)のほか、配列番号:11で表わされるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなる変異ポリペプチドであって、PLAP活性を有し、かつ、細胞外に分泌されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明において使用することができる。

[0082] 配列番号:10で表される核酸配列と実質的に同一の核酸配列を有するポリヌクレオチドとして、配列番号:12および配列番号:14が挙げられる。これらのポリヌクレオチドは、pSEAP、pSEAP2(クロンテック社製)の部分配列からなるポリヌクレオチドであ

り、クロンテック社から購入することができる。

[0083] また、本発明のPLAPをコードするポリヌクレオチドは、配列番号:10に記載の核酸配列を基にプライマーを設計し、遺伝子増幅技術 (PCR) (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 6.1-6.4)により、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物、好ましくはヒトのcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーから得ることができる。

[0084] 以下に、本発明のPLAPをコードするポリヌクレオチドを取得する方法の一例を記載する。

ベクタープラスミドM13tg131 (Kiney, et. al. (1983) 26(1): 91-99)をPvu IIで切断し、MCS配列断片を得ることができる。当該MCS配列断片をベクタープラスミドpUC18(東洋紡績株式会社)のPvu IIサイト中へ、リガーゼ反応(TAKARA, Cat.6022)により挿入しベクタープラスミドpUG131を得ることができる。

ヒト胎盤cDNAライブラリーを鋳型として、配列番号:16および配列番号:17で示したオリゴDNAをプライマーとしてPCR反応を行って273 bpのPLAP cDNA断片1を得ることができる。次に、ヒト胎盤cDNAライブラリーを鋳型として、配列番号:18および配列番号:19で示したオリゴDNAをプライマーとしてPCR反応を行って1028 bpのPLAP cDNA断片2を得ることができる。プライマーの塩基配列は以下のとおりである。

プライマー:CCAGAATTCCTGCCTCGCCACTGTCC (配列番号:16)

プライマー:TTAGGATCCTGGCAGCTGTCC (配列番号:17)

プライマー:GTGACAGCTGCCAGGATCCTAA (配列番号:18)

プライマー:AGGACCGTGTAGGCCTCCCTGT (配列番号:19)

当該PLAP cDNA断片1および2をBam HIで切断後、リガーゼ反応(TAKARA, Cat.6022)により連結し、PLAP cDNA断片3を得ることができる。次に、当該PLAP cDNA断片3をEco RIおよびSma Iで切断し、Eco RIおよびSma Iで切断されたpBlueScript KS (Stratagene) 中へ、リガーゼ反応(TAKARA, Cat.6022)により挿入することができる。得られたプラスミドをHind IIIおよびXma Iで切断して、PLAP cDNA断片4を得ることができる。

[0085] PLAP cDNAの3'側断片を合成するために、配列番号:20および配列番号:21で示

したオリゴDNAを適当な条件でアニーリングさせた後、DNA polymeraseを用いて二本鎖DNA断片とし、pUG131のHinc IIサイトにリガーゼ反応 (TAKARA, Cat.6022) により挿入することができる。次に、当該プラスミドをXma IおよびAat IIで切断して、PLAP cDNA断片5を得ることができる。オリゴDNAの塩基配列は以下のとおりである。

オリゴDNA:

AAGCCCGGGATCGTAAGGCCTACACAGTGCTACTGTATGGCAATGGCCCAG
GGTATGTCCTAAAGGATGGAGCTAGACCAGATGTCACAGAGTCAGAG (配列
番号:20)

オリゴDNA:

AAAGACAGCGACGTCTTCCCCTGCGTGAGTCTCTTCATCTAACGGTACGGC
CGATTGCTGACGGTACTCTGGAGATCCAGACTCTGACTCTGTGACAT (配列
番号:21)

[0086] 同様に、配列番号:22および配列番号:23で示したオリゴDNAを適当な条件でアニーリングさせた後、DNA polymeraseを用いて二本鎖DNA断片とし、pUG131のHinc IIサイトにリガーゼ反応 (TAKARA, Cat.6022) により挿入することができる。次に、当該プラスミドをAat IIおよびBgl IIで切断して、PLAP cDNA断片6を得ることができる。オリゴDNAの塩基配列は以下のとおりである。

オリゴDNA:

GGAAGACGTCGCTGTCTTTGCAAGAGGTCCCCAGGCACATCTCGTGTCATGG
CGTACAGGAACAGACTTTCATCGCTCATGTAATGGCATTTCGCAGCAT (配列
番号:22)

オリゴDNA:

TCCAGATCTGGGTAAACCTGGATGGGCAGCGTCTGTCGTACCTGCTGGTGG
AGCTAAATCGCAAGCGGTATATGGCTCCAAACATGCTGCGAATGCCATT (配
列番号:23)

当該PLAP cDNA断片5および6を、あらかじめXma IおよびBgl IIで切断したpUG131中へ、リガーゼ反応 (TAKARA, Cat.6022) により挿入することができる。当該プラスミドをXma IおよびBgl IIで切断することにより、PLAP cDNA断片7を得ることが

できる。

- [0087] 続いて、配列番号:24および配列番号:25で示したオリゴDNAを合成し、アニーリングさせてアダプターDNA1を得ることができる。オリゴDNAの塩基配列は以下のとおりである。

オリゴDNA:AATTCAAGCTTACCATG (配列番号:24)

オリゴDNA:GTAAGCTTG (配列番号:25)

一方、PLAP cDNA断片4とPLAP cDNA断片7を、pUG131のHind III / Bgl IIサイトにリガーゼ反応(TAKARA, Cat.6022)により挿入することができる。当該プラスミドをEco RIおよびSph Iで切断し、当該アダプターDNA1をリガーゼ反応(TAKARA, Cat.6022)により挿入することができる。以上の操作により、本発明のPLAPをコードするポリヌクレオチド(配列番号:10)を得ることができる。

- [0088] 本発明のPLAPをコードするポリヌクレオチドに含まれる、配列番号:11で表されるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特にSection8.1-8.5)、Hashimoto-Goto et al. (1995) Gene 152: 271-5、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92、Kramer and Fritz (1987) Method. Enzymol. 154: 350-67、Kunkel (1988) Method. Enzymol. 85: 2763-6等に記載の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製することができる。

また、ポリヌクレオチドに変異を導入するには、Kunkel法や Gapped duplex法等の公知手法により、部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット、例えば QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit (ストラタジーン社製)、GeneTailorTM Site-Directed Mutagenesis System (インビトロジェン社製)、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System (Mutan-K、Mutan-Super Express Km等:タカラバイオ社製)等を用いて行うことができる。

- [0089] 本発明のPLAPをコードするポリヌクレオチドの核酸配列の確認は、慣用の方法により配列決定することにより行うことができる。例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーン

ターミネーション法(Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463) 等により行うことができる。また、適当なDNAシーケンサーを利用して配列を解析することも可能である。

[0090] また、本発明のPLAPベクターは、pSEAP、pSEAP2(クロンテック社製)に転写制御配列を挿入することによっても得ることができる。転写制御配列の挿入は、常法に従い行うことができる。

[0091] 12. 本発明のPLAPベクターが導入された細胞

本発明のPLAPベクターが導入された細胞(本明細書において、「本発明のPLAPベクター導入細胞」と称する場合がある)の作製は、常法により上述の本発明のPLAPベクターを細胞にトランスフェクションすることにより行うことができる。

以下に、本発明のPLAPベクター導入細胞の作製方法について詳細に説明する。

[0092] 本発明のPLAPベクターを導入する細胞は、動物に移植可能なものであれば何でもよく、その種類は限定されない。好ましくは、哺乳動物由来の真核細胞(例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓 β 細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞、不死化細胞もしくは腫瘍細胞など)が挙げられ、特に好ましくは不死化細胞又は腫瘍細胞が挙げられる。

[0093] 宿主細胞への本発明のPLAPベクターの導入は、エレクトポレーション法(Chu et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15: 1311-26)、カチオニックリポソーム法、電気パルス穿孔法(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 9.1-9.9)、微小ガラス管を使用した直接注入法、マイクロインジェクション法、リポフェクション(Derijard (1994) Cell 7: 1025-37; Lamb (1993) Nature Genetics 5: 22-30; Rabindran et al. (1993) Science 259: 230-4)、リポフェクタミン法(GIBCO-BRL)、リン酸カルシウム法(Chen and Okayama (1987) Mol. Cell. Biol. 7: 2745-52)、DEAEデキストラン法(Lopata et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12: 5707-17; Sussman and

Milman (1985) Mol. Cell. Biol. 4: 1642-3)、FuGene6試薬(Boehringer-Mannheim)等により行うことができる。

[0094] 宿主細胞の培養は、選択した細胞に適した公知の方法により行うことができる。例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM、F12等の培地を用い、必要に応じウシ胎児血清(FCS)等の血清、アミノ酸、グルコース、ペニシリン又はストレプトマイシンなどを添加することができ、pH約6〜8、30〜40℃において15〜200時間前後の培養を行うことができる。その他、必要に応じ途中で培地の交換を行ったり、通気及び攪拌を行ったりすることができる。

[0095] 本発明のPLAPベクター導入細胞は、そのまま用いることも可能であるが、培養中に性質が偏ることを避けるため、および／または、本発明のPLAPがより多く発現している細胞を取得し安定した評価を可能とするためにクローニングを行うことができる。細胞のクローニングは、常法(例えば、限外希釈法、フローサイトメトリーによるセルソーティング等)により行うことができる。クローニング後の細胞株から、PLAP活性の測定、分子生物学的手法(例えば、定量的RT-PCR法、ノーザンブロットイングなど)によるPLAP mRNAコピー数の解析等により最適な本発明のPLAPベクター導入細胞株を選別することができる。

[0096] 13. 本発明のPLAP量の測定方法

本発明のPLAPを含む試料に含まれる本発明のPLAP量は、既存の方法により測定できる。ここで、本発明のPLAPを含む試料としては、本発明のPLAPを含む試料であれば特に限定なく用いることができるが、後述の生体液、例えば、血液、血漿、血清、尿、脳脊髄液など、より好ましくは血液、血漿又は血清、特に好ましくは血漿を用いることができる。

[0097] 本発明のPLAP量の測定方法は、特に限定されず、例えば、免疫学的手法(例えば、ELISA、RIA、EIA、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット等)、クロマトグラフィー、マススペクトロメトリー、酵素活性等により測定することができる。本発明のPLAP量は、酵素活性により測定することが好ましいため、以下にPLAP活性の測定方法について、以下に記載する。

(1) In vitroにおける本発明のPLAP活性の測定方法

PLAP活性は、本発明のPLAPベクター導入細胞を適当な時間培養し、培養上清を基質溶液と混合し、適当な時間インキュベートした後、化学発光強度を測定すること又は比色法を用いること、好ましくは化学発光強度を測定することによって、測定することができる。

[0098] 以下、より詳細に記載する。

本発明のPLAPベクター導入細胞は、上述のように得ることができ、培養することができる。培養液にFCSを加える場合には、当該FCS中のPLAP活性を失活させるため、熱処理をすることが望ましい。熱処理は、50℃から80℃、好ましくは60℃から70℃、特に好ましくは64℃から66℃で、5分から120分、好ましくは20分から60分加熱することにより行うことができる。

[0099] PLAP活性を測定する際には、あらかじめ培養した本発明のPLAPベクター導入細胞を、細胞培養プレートに蒔き、さらに培養することが望ましい。

適当な時間(例えば、2-96時間)培養した後、培養上清を回収する。回収した培養上清中に含まれる血清由来のPLAP活性を失活させるため、50℃から80℃、好ましくは60℃から70℃、特に好ましくは64℃から66℃で、5分から120分、好ましくは20分から60分加熱することができる。

[0100] 次に、培養上清を基質溶液と混合する。基質溶液は、PLAPの基質となる物質を含み、PLAPが反応して化学発光を起こすものであれば、その種類は限定されない。基質には、例えば、4-methoxy-4-(3-phosphatephenyl) spiro [1,2-dioxetane-3,2'-adamantane], disodium salt (例えば、Lumi-Phos 530 (Lumigen, Inc.) など) を用いることができる。また、基質を溶解する溶液としては、種々の緩衝液を使用することができ、例えば、0.28 M Na_2CO_3 - NaHCO_3 、8 mM MgSO_4 、pH 10.0からなる水溶液などを用いることができる。培養上清は、適当に希釈して用いることができ、基質溶液の10% (v/v) 程度になるように加えることが望ましい。

[0101] 培養上清を基質溶液と混合し、適当な時間インキュベートする。インキュベートは、5℃から38℃、好ましくは15℃から30℃、特に好ましくは20℃から25℃で、10分から24時間、好ましくは30分から4時間行うことができる。インキュベート中は、遮光することが望ましい。

[0102] インキュベーション後、化学発光強度を測定する。化学発光強度は、市販のプレートリーダー（例えば、Perkin Elmer, ARVO）を用いることによって測定できる。測定の結果得られた値をPLAP活性とすることができる。

[0103] (2) In vivoにおける本発明のPLAP活性の測定方法

PLAP活性は、本発明のPLAPベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた本発明のPLAPを産生する非ヒト動物モデルにおいて、生体液を基質溶液と混合し、適当な時間インキュベートした後、化学発光強度を測定すること又は比色法を用いること、好ましくは化学発光強度を測定することによって、測定することができる。

[0104] 以下、より詳細に記載する。

上述の方法により、本発明のPLAPベクター導入細胞を非ヒト動物に移植する。

移植後、適当な期間（例えば、1時間から1095日、好ましくは2時間から365日、より好ましくは24時間から180日など）飼育し、生体液を採取する。生体液は、当該非ヒト動物由来のものであれば、その種類は限定されないが、例えば、血液、血漿、血清、尿、脳脊髄液など、好ましくは血液、血漿又は血清、より好ましくは血漿または血清、特に好ましくは血漿である。

採取した生体液は、必要に応じてPLAPを含む画分と含まない画分を分離することができる。血液の場合には、遠心によって、血漿を分離し、血漿を生体液として用いることが望ましい。分離した生体液は、PLAP活性を測定するまで、適当な温度、好ましくは4℃以下、特に好ましくは-20℃以下で保存することができる。

[0105] PLAP活性は、後述の非ヒト動物における内在性のアルカリフォスファターゼに由来するアルカリフォスファターゼ活性と区別して測定することが望ましい。本発明のPLAPに由来するPLAP活性を内在性のアルカリフォスファターゼに由来するアルカリフォスファターゼ活性と区別する方法としては、本発明のPLAPを分解および／または失活させないが、内在性のアルカリフォスファターゼを分解および／または失活させる条件下で処理することにより、本発明のPLAPに由来するPLAP活性を内在性のアルカリフォスファターゼに由来するアルカリフォスファターゼ活性と区別して測定することができる。内在性のアルカリフォスファターゼを分解および／または失活させる

条件としては、例えば、熱処理などが挙げられる。

例えば、生体液中に含まれる非ヒト動物由来のアルカリフォスファターゼ活性を失活させるため、50℃から80℃、好ましくは60℃から70℃、特に好ましくは64℃から66℃で、5分から120分、好ましくは20分から60分加熱することができる。

[0106] 次に、生体液を基質溶液と混合する。基質溶液は、PLAPの基質となる物質を含み、PLAPが反応して化学発光を起こすものであれば、その種類は限定されない。基質には、例えば、4-methoxy-4-(3-phosphatephenyl) spiro [1,2-dioxetane-3,2'-adamantane], disodium salt (例えば、Lumi-Phos 530 (Lumigen, Inc.) など) を用いることができる。また、基質を溶解する溶液としては、種々の緩衝液を使用することができ、例えば、0.28 M Na_2CO_3 - NaHCO_3 、8 mM MgSO_4 、pH 10.0からなる水溶液などを用いることができる。生体液は、適当に希釈して用いることができ、基質溶液の1から10% (v/v) 程度加えることが望ましい。

[0107] 生体液を基質溶液と混合し、適当な時間インキュベートする。インキュベートは、5℃から38℃、好ましくは15℃から30℃、特に好ましくは20℃から25℃で、10分から24時間、好ましくは30分から4時間行うことができる。インキュベート中は、遮光することが望ましい。

[0108] インキュベーション後、化学発光強度を測定する。化学発光強度は、市販のプレートリーダー (例えば、Perkin Elmer, ARVO) を用いることによって測定できる。測定の結果得られた値をPLAP活性とすることができる。

[0109] 14. 非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法

本発明のPLAPベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた本発明のPLAPを産生する非ヒト動物モデルにおいて、生体液中のPLAP活性を測定し、得られたPLAP活性を指標とすることによって、非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写制御配列を介した転写活性を測定することができる。

[0110] 以下、より詳細に記載する。

本発明のPLAPベクター導入細胞は、前述のように得ることができ、培養することができる。また、移植する細胞は、in vivoで培養されたものであってもよい (Asano et al, Jpn J Cancer Res. 1999 Jan;90(1):93-100)。

- [0111] 本発明のPLAPベクター導入細胞を、非ヒト動物に移植する。移植される非ヒト動物は、特に限定されず、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、イヌ、サル、ニワトリ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ネコなどがあげられ、好ましくはマウスおよびラット、特に好ましくはマウスである。また、非ヒト動物への移植部位は、特に限定されず、例えば、皮下、腹腔内、血中、臓器(例えば、脳、脳の各部位(例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髓、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など)があげられる。
- [0112] 移植する細胞数は、特に限定されず、例えば、 10^2 から 10^9 cells/head、好ましくは 10^4 から 10^8 cells/head、より好ましくは 10^5 から 10^7 cells/head、特に好ましくは 5×10^5 から 5×10^6 cells/headである。
- [0113] 移植に際しては、細胞をそのまま移植しても良いし、細胞以外に薬学的に許容される担体を含んだものを移植してもよい。担体としては、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液、血清、生体液およびカルボキシメチルセルロース液などが挙げられる。また、細胞の足場となる固体(例えば、cytodex3 (Amersham Bioscience, 17-0485-01)等)、細胞外基質成分(例えば、コラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、ヘパラン硫酸、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン、エラスチンまたはこれら2種以上の組み合わせ等)またはゲル状の支持体などと組み合わせて移植してもよい。
- また、移植に際しては、血管新生因子(例えば、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、酸性線維芽細胞増殖因子(aFGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β)、アンジオポエチン(angiotensin)、肝細胞増殖因子(HGF)等)を含んだものを移植してもよい。
- [0114] 移植後、適当な期間(例えば、1時間から1095日など)飼育し、生体液を採取する。生体液は、当該非ヒト動物由来のものであれば、その種類は限定されないが、例えば、血液、血漿、血清、尿、脳脊髄液など、好ましくは血液、血漿又は血清、より好ま

しくは血漿または血清、特に好ましくは血漿である。

採取した生体液は、必要に応じて本発明のPLAPを含む画分と含まない画分を分離することができる。血液の場合には、遠心によって、血漿を分離し、血漿を生体液として用いることが望ましい。分離した生体液は、PLAP活性を測定するまで、適当な温度、好ましくは4℃以下、特に好ましくは-20℃以下で保存することができる。

PLAP活性は、上述のPLAP活性の測定方法により測定することができる。

[0115] ここで、本発明のPLAPは、本発明のPLAPベクターから転写され、本発明のPLAPに翻訳されて生体液に分泌されたPLAPである。よって、上記方法によって得られたPLAP活性は、本発明のPLAPベクターにおける転写活性に依存して変化するものであり、当該PLAP活性を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標することで、本発明のPLAPベクターに挿入した転写制御配列を介した転写活性を測定することができる。

[0116] 15. 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法

本発明のPLAPベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた本発明のPLAPを産生する非ヒト動物モデルに被検化合物を投与し、生体液中のPLAP活性を測定し、PLAP活性を変化させる化合物を選択することによって、非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングすることができる。

また、被検化合物を投与された非ヒト動物に本発明のPLAPベクター導入細胞を移植することによって得られた本発明のPLAPを産生する非ヒト動物モデルにおいて、生体液中のPLAP活性を測定し、PLAP活性を変化させる化合物を選択することによって、非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングすることができる。

[0117] 以下、より詳細に記載する。

非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法においては、本発明のPLAPベクターには、転写制御因子結合配列を有するポリヌクレオチドを含んでいることが好ましい。転写制御因子結合配列は、特に限定されず、例えば、HRE、IL4RE、E2F結合塩基配列、エストロゲン受容体結合配列、GATA-1

結合塩基配列、AP1結合塩基配列、p53結合塩基配列その他の転写因子結合配列などを使用することができ、好ましくは、HRE又はIL4REである。

HREとしては、例えば、配列番号:1で表される配列、配列番号:2で表される配列、配列番号:3で表される配列、配列番号:4で表される配列などがあげられ、好ましくは、配列番号:1で表される配列があげられる。

IL4REとしては、例えば、配列番号:5で表される配列、配列番号:6で表される配列、配列番号:7で表される配列、配列番号:8で表される配列などがあげられ(Martin Seidel, et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol92:3041-3045)、好ましくは、配列番号:8で表される配列が挙げられる。

[0118] 前述の方法で、本発明のPLAPベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、非ヒト動物モデルを作製することができる。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与方法は、特に限定されず、例えば、経口投与、静脈投与、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与、頭蓋内投与等があげられる。また、対照群として無投与、ビークル投与を設定することができる。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与量は、特に限定されず、例えば、1ng/kgから1g/kg、好ましくは100ng/kgから1g/kg、より好ましくは1mg/kgから1g/kg、特に好ましくは10mg/kgから300mg/kgである。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与時期は、特に限定されず、例えば、細胞移植前、細胞移植時、細胞移植後などである。

生体液中のPLAP活性の測定は、前述の方法で行うことができる。

化合物を投与した非ヒト動物モデルの生体液中のPLAP活性を、対照群の生体液中のPLAP活性と比較することにより、転写活性に影響を与える化合物のスクリーニングを行うことができる。当該スクリーニング方法においては、例えば、化合物を投与された非ヒト動物モデルの生体液中のPLAP活性が、対照群の生体液中のPLAP活性に比べ、1.2倍以上、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは2.0倍以上、特に好ましくは3.0倍以上増加または減少した場合に、転写活性に影響を与えると判断することができる。

[0119] 本発明において、被検化合物には、ペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化

合物、合成化合物、ポリヌクレオチド、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが含まれる。ポリヌクレオチドには、例えば、アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイムヌクレオチド、double strand RNAなどが含まれる。ここで、double strand RNAとは、RNA干渉(Fire, et. al. (1998) Nature, 391:806-811)を引き起こす二本鎖RNAをいう。

[0120] 16. 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積を測定する方法

本発明のPLAPベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた本発明のPLAPを産生する非ヒト動物モデルにおいて、生体液中のPLAP活性を測定し、得られたPLAP活性を指標とすることによって、非ヒト動物モデルにおける移植細胞数を測定することができる。

また、本発明のPLAPベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することにより、非ヒト動物に腫瘍を惹起させ、当該腫瘍において本発明のPLAPを産生させることができる。この場合、当該非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を測定し、得られたPLAP活性を指標とすることにより、腫瘍体積を測定することができる。

[0121] 以下、より詳細に記載する。

非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積を測定する方法においては、本発明のPLAPベクターには、恒常的転写制御配列からなるポリヌクレオチドを含んでいることが好ましい。ここで、恒常的転写制御配列とは、恒常的に転写開始活性を有している配列をいう。恒常的転写制御配列は、恒常的に転写開始活性を有している配列であれば特に限定されず、例えば、SV40プロモーター、CMVプロモーター、チミジンキナーゼプロモーター、Ubiquitin Cプロモーター、Elongation factor 1 alpha (EF1a) プロモーター、 β -actinプロモーター、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase プロモーター、Phosphoglycerokinaseプロモーター、 β 2-Microglobulinプロモーター、 β -Glucuronidaseプロモーター等を使用することができる。SV40プロモーターとしては、例えば、配列番号:9で表される配列があげられる。

前述の方法で、本発明のPLAPベクター導入細胞を非ヒト動物モデルに移植し、生

体液中のPLAP活性の測定を行うことができる。

- [0122] ここで、恒常的転写制御配列による転写活性は、常に一定の活性を示すと考えられるため、移植細胞数に依存した量の本発明のPLAPが生体液中に分泌される。よって、上記方法によって得られたPLAP活性は、非ヒト動物モデルにおける移植細胞数に依存して変化するものであり、当該PLAP活性を測定し、得られたPLAP活性を指標とすることで、移植細胞数を測定することができる。

また、本発明において、「移植細胞数」とは、非ヒト動物に人為的に移植された細胞由来の細胞数をいい、非ヒト動物中において増加または減少した後の細胞数をも含む概念である。

- [0123] したがって、飼育する前および適当な期間飼育した後での生体液中のPLAP活性を比較することにより、非ヒト動物モデルにおいて、移植した細胞数の増減を測定することができる。また、固形腫瘍においては、細胞数は腫瘍体積と相関すると考えられるため、非ヒト動物に固形腫瘍を惹起させた場合は、腫瘍体積の増減をも測定することができる。

- [0124] 17. 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法

本発明のPLAPベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた本発明のPLAPを産生する非ヒト動物モデルに化合物を投与し、生体液中のPLAP活性を測定し、PLAP活性を変化させる化合物を選択することによって、非ヒト動物モデルにおいて、移植細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングすることができる。

また、化合物を投与された非ヒト動物に本発明のPLAPベクター導入細胞を移植することによって得られた本発明のPLAPを産生する非ヒト動物モデルにおいて、生体液中のPLAP活性を測定し、PLAP活性を変化させる化合物を選択することによって、非ヒト動物モデルにおいて、移植細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングすることができる。

さらに、本発明のPLAPベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することにより、非ヒト動物に腫瘍を惹起させ、当該腫瘍において本発明のPLAPを産生させることができる。この場合、当該非ヒト動物モデルに化合物を投与し、生体液中のPLAP活性を測定

し、分泌タンパク質量を変化させる化合物を選択することによって、非ヒト動物において、腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングすることができる。

[0125] 以下、より詳細に記載する。

非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法においては、本発明のPLAPベクターには、恒常的転写制御配列からなるポリヌクレオチドを含んでいることが好ましい。ここで、恒常的転写制御配列とは、恒常的に転写開始活性を有している配列をいう。恒常的転写制御配列は、恒常的に転写開始活性を有している配列であれば特に限定されず、例えば、SV40プロモーター、CMVプロモーター、チミジンキナーゼプロモーター、Ubiquitin Cプロモーター、Elongation factor 1 alpha (EF1a) プロモーター、 β -actinプロモーター、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase プロモーター、Phosphoglycerokinaseプロモーター、 β 2-Microglobulinプロモーター、 β -Glucuronidaseプロモーター等を使用することができる。SV40プロモーターとしては、例えば、配列番号:9で表される配列があげられる。

前述の方法で、本発明のPLAPベクター導入細胞を移植し、非ヒト動物モデルを作製することができる。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与方法は、特に限定されず、例えば、経口投与、静脈投与、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与、頭蓋内投与等があげられる。対照群として無投与、ビークル投与を設定することができる。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与量は、特に限定されず、例えば、1ng/kgから1g/kg、好ましくは100ng/kgから1g/kg、より好ましくは1mg/kgから1g/kg、特に好ましくは10mg/kgから300mg/kgである。

非ヒト動物モデルへの化合物の投与時期は、特に限定されず、例えば、細胞移植前、細胞移植時、細胞移植後などである。

生体液中のPLAP活性の測定は、前述の方法で行うことができる。

[0126] 化合物を投与された非ヒト動物モデルの生体液中のPLAP活性を、対照群の生体液中のPLAP活性と比較することにより、移植細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングすることができる。また、固形腫瘍においては、細胞数は腫瘍体積と関連する

と考えられるため、腫瘍体積に影響を与える化合物をもスクリーニングすることができる。当該スクリーニング方法においては、例えば、化合物を投与された非ヒト動物モデルの生体液中のPLAP活性が、対照群の生体液中のPLAP活性に比べ、1.2倍以上、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは2.0倍以上、特に好ましくは3.0倍以上増加または減少した場合に、移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与えると判断することができる。

[0127] 18. 測定キット

分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼ発現ベクターを含有する測定キットは、(1)非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法(前記「14. 非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法」を示す)、(2)非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「15. 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)、(3)非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「16. 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)、又は、(4)非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「17. 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)に用いるものであり、本発明のPLAPベクターを含んでいればよく、その他の組成は限定されない。

当該測定キットに含有されるものとしては、例えば、コントロールベクター、トランスフェクション試薬、細胞培養液、PLAP基質溶液、PLAP活性測定用緩衝液などが挙げられる。

[0128] 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼ発現ベクター導入細胞を含有する測定キットは、(1)非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法(前記「14. 非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法」を示す)、(2)非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前

記「15. 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)、(3)非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「16. 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)、又は、(4)非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「17. 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)に用いるものであり、本発明のPLAPベクター導入細胞を含んでいればよく、その他の組成は限定されない。

当該測定キットに含有されるものとしては、例えば、コントロール細胞、細胞培養液、PLAP基質溶液、PLAP活性測定用緩衝液などが挙げられる。

[0129] 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼ発現ベクター導入細胞を移植した非ヒト動物を含有する測定キットは、(1)非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法(前記「14. 非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性の測定方法」を示す)、(2)非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「15. 非ヒト動物モデルにおいて、転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)、(3)非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「16. 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)、又は、(4)非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法(前記「17. 非ヒト動物モデルにおいて、PLAP活性を指標として移植細胞数および／または腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法」を示す)に用いるものであり、本発明のPLAPベクター導入細胞を移植した非ヒト動物を含んでいればよく、その他の組成は限定されない。

当該測定キットに含有されるものとしては、例えば、コントロール非ヒト動物、PLAP基

質溶液、PLAP活性測定用緩衝液などが挙げられる。

- [0130] 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

cDNA : 相補的デオキシリボ核酸

A : アデニン

T : チミン

G : グアニン

C : シトシン

U : ウラシル

N : アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)またはチミン(T)

RNA : リボ核酸

mRNA : メッセンジャーリボ核酸

dATP : デオキシアデノシン三リン酸

dTTP : デオキシチミジン三リン酸

dGTP : デオキシグアノシン三リン酸

dCTP : デオキシシチジン三リン酸

Gly又はG : グリシン

Ala又はA : アラニン

Val又はV : バリン

Leu又はL : ロイシン

Ile又はI : イソロイシン

Ser又はS : セリン

Thr又はT : スレオニン

Cys又はC : システイン

Met又はM : メチオニン

Glu又はE :グルタミン酸

Asp又はD :アスパラギン酸

Lys又はK :リジン

Arg又はR :アルギニン

His又はH :ヒスチジン

Phe又はF :フェニルアラニン

Tyr又はY :チロシン

Trp又はW :トリプトファン

Pro又はP :プロリン

Asn又はN :アスパラギン

Gln又はQ :グルタミン

[0131] 本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号:1] HREの核酸配列を示す。

[配列番号:2] HREの核酸配列を示す。

[配列番号:3] HREの核酸配列を示す。

[配列番号:4] HREの核酸配列を示す。

[配列番号:5] IL4REのコンセンサス核酸配列を示す。

[配列番号:6] IL4REのコンセンサス核酸配列を示す。

[配列番号:7] IL4REのコンセンサス核酸配列を示す。

[配列番号:8] IL4REの核酸配列を示す。

[配列番号:9] SV40の核酸配列を示す。

[配列番号:10] 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸配列を示す。

[配列番号:11] 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼのアミノ酸配列を示す。

[配列番号:12] 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸配列を示す。

[配列番号:13] 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼのアミノ酸配列を示す。

[配列番号:14] 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸配列を示す。

[配列番号:15] 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼのアミノ酸配列を示す。

[配列番号:16] 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのプライ

マー塩基配列を示す。

[配列番号:17]分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのプライマー塩基配列を示す。

[配列番号:18]分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのプライマー塩基配列を示す。

[配列番号:19]分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのオリゴDNA配列を示す。

[配列番号:20]分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのオリゴDNA配列を示す。

[配列番号:21]分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのオリゴDNA配列を示す。

[配列番号:22]分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのオリゴDNA配列を示す。

[配列番号:23]分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのオリゴDNA配列を示す。

[配列番号:24]分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのオリゴDNA配列を示す。

[配列番号:25]分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼの核酸を得るためのオリゴDNA配列を示す。

[配列番号:26]マルチクローニングサイト(MCS)の塩基配列を示す。

[配列番号:27]マルチクローニングサイト(MCS)の塩基配列を示す。

[配列番号:28]HIF-Response element(HRE)作製のための核酸配列を示す。

[配列番号:29]HIF-Response element(HRE)作製のための核酸配列を示す。

[配列番号:30]CMVプロモーターを得るためのプライマー塩基配列を示す。

[配列番号:31]CMVプロモーターを得るためのプライマー塩基配列を示す。

[配列番号:32]ヒトH1プロモーターを得るためのプライマー塩基配列を示す。

[配列番号:33]ヒトH1プロモーターを得るためのプライマー塩基配列を示す。

[配列番号:34]リンカーDNAの塩基配列を示す。

[配列番号:35]リンカーDNAの塩基配列を示す。

[配列番号:36]HIF-1 α mRNAの部分塩基配列を示す。

[配列番号:37]HIF-1 α dsRNA作製用オリゴDNAの塩基配列を示す。

[配列番号:38]HIF-1 α dsRNA作製用オリゴDNAの塩基配列を示す。

[配列番号:39]CRBP2のプロモーター領域にあるRXRが結合する配列を作製するための塩基配列を示す。

[配列番号:40]CRBP2のプロモーター領域にあるRXRが結合する配列を作製するための塩基配列を示す。

[配列番号:41]IL4RE作製のための核酸配列を示す。

[配列番号:42]IL4RE作製のための核酸配列を示す。

[配列番号:43]STAT6の核酸を得るためのプライマー塩基配列を示す。

[配列番号:44]STAT6の核酸を得るためのプライマー塩基配列を示す。

実施例

[0132] 以下に、具体的な例をもって本発明を示すが、本発明はこれに限られるものではない。

[実施例1]PLAP basicベクタープラスミドの作製

TNF- α -PLAPベクタープラスミド (Goto, et. al. (1996) Molecular Pharmacology, 49:860-873)のTNF- α -promoter部分を除いて、代わりにマルチクローニングサイト(MCS)からなるポリヌクレオチドを挿入してPLAP basicベクタープラスミドを得た。より具体的には、配列番号:26および配列番号:27で示したオリゴDNAを作製し(株式会社日本バイオサービスに依頼)、それぞれ100 μ MになるようにTEバッファー(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA)で溶解した。この100 μ MのオリゴDNA溶液を25 μ lずつ混和して、95°Cで10分間熱した後に、37°C 1時間、室温 1時間で冷却してオリゴDNAをアニーリングさせ、MCS オリゴDNAを得た。オリゴDNAの塩基配列は以下のとおりである。

オリゴDNA:CGAGCTCTTACGCGTGCTAGCCCGGGCTCGAGA(配列番号:26)

オリゴDNA:AGCTTCTCGAGCCCGGGCTAGCACGCGTAAGAGCTCGGTAC(配列番号:27)

次に、あらかじめKpn I およびHindIIIで切断しておいたTNF- α -PLAPベクタープラスミドにMCS オリゴDNAをリガーゼ反応(タカラバイオ株式会社、Cat.6022)により挿入した。常法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems)により配列を確認し、PLAP basicベクタープラスミドを得た(図1)。

[0133] [実施例2]HRE-PLAPレポータープラスミドの作製

転写制御因子結合配列HREは、低酸素で転写促進活性が誘導されることが知られている(Kimura, et. al. (2001) The Journal of Biological Chemistry, 276: 2292-2298)。PLAP basicベクタープラスミドのKpn IサイトにHREからなるポリヌクレオチドを直列に3個挿入し、HREx3-PLAPを得た。より具体的には、VEGF遺伝子のプロモーター配列のHRE配列(Forsythe, et. al. (1996) Molecular and Cellular Biology, 16(9): 4604-4613)を参考にして配列番号:28および配列番号:29で示したオリゴDNAを作製し(株式会社日本バイオサービスに依頼)、それぞれ100 μ MになるようにTEバッファー(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA)で溶解した。この100 μ MのオリゴDNA溶液を25 μ lずつ混和して、95°Cで10分間熱した後に、37°C 1時間、室温 1時間で冷却してオリゴDNAをアニーリングさせ、HREオリゴDNAを得た。オリゴDNAの塩基配列は以下の通りである。

オリゴDNA:CACAGTGCATACGTGGGCTCCAACAGGTCCTCTTCGTAC (配列番号:28)

オリゴDNA:GAAGAGGACCTGTTGGAGCCCACGTATGCACTGTGGTAC (配列番号:29)

次に、PLAP basicベクターをKpn Iで切断して、HREオリゴDNA をリガーゼ反応(タカラバイオ株式会社、Cat.6022)により挿入した。常法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、配列番号:28の3'側がPLAP basicベクタープラスミドのHind IIIサイト側に向いているクローンを選びHREx1-PLAPベクタープラスミドとした。さらにHREx1-PLAPベクタープラスミドをKpn Iで切断して、HREオリゴDNA をリガーゼ反応により挿入し、上記方法と同様にHREx2-PLAPベクタープラスミドを作製した。さらに、HREx2-PLAPベクタ

ープラスミドをKpn Iで切断して、HREオリゴDNA をリガーゼ反応により挿入し、上記方法と同様にHREx3-PLAPベクタープラスミドを作製した。ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems)によりHREx3-PLAPベクタープラスミドの配列を確認した。その結果、タンデムに挿入された3個のHREのうち一つのHRE部分に1塩基の欠失が認められた、すなわち、配列番号:28の5'側から6 bp目のTが欠失していた。このTはHRE活性化には必須の塩基ではない(Kimura, et. al. (2001) The Journal of Biological Chemistry, 276: 2292-2298)ので、当該HREx3-PLAPベクタープラスミドを以下の実験に用いることにした。

- [0134] 次に、pCDNA3.1/Hygro (+) (Invitrogen)のCMVプロモーター部分をPCR反応で増幅し、HREx3-PLAPベクタープラスミドのMlu I / Hind IIIサイトに挿入して、HRE-PLAPレポータープラスミドを得た。より具体的には、pCDNA3.1/Hygro (+)を鋳型とし、配列番号:30および配列番号:31で示したオリゴDNA(インビトロジェン株式会社に依頼して作製した)をプライマーとして、Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostic)を用い、(94℃ 30秒、60℃ 30秒、72℃ 60秒)を15回繰り返すことによりPCR反応を行った。プライマーの塩基配列は以下のとおりである。

プライマー:GGCGGTACGCGTGTACGGTGGGAGGTC(配列番号:30)

プライマー:TACCAAGCTTAAGTTTAAACGC(配列番号:31)

このPCR反応によって得られたDNA断片をMlu IおよびHind IIIで切断し、Mlu IおよびHind IIIで切断されたHREx3-PLAPベクタープラスミド中へ、リガーゼ反応(タカラバイオ株式会社、Cat.6022)により挿入した。常法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems)により配列を確認し、HRE-PLAPレポータープラスミド(図2)を得た。

- [0135] [実施例3] HRE-PLAPレポータープラスミド安定導入細胞の作製

実施例2で得たHRE-PLAPレポータープラスミドをヒト卵巣癌細胞株SK-OV-3細胞に導入し、低酸素によるPLAP発現誘導率の高いクローンをクローニングした。

以下、詳細に記載する。

1. 細胞へのHRE-PLAPレポータープラスミドの導入

RPMI培養液で継代培養したSK-OV-3細胞(American Type Culture Collection、HTB-77)を回収し、RPMI培養液を用いて 25×10^4 cells/mlになるように懸濁した。ここで、PRMI培養液とは、RPMI (SIGMA, R8758) 500 mlにPenicillin Streptomycin (Invitrogen, 15140-122) 5 ml、100mM Pyruvate (Invitrogen, 11360-070) 5 ml、2-Mercaptoethanol (Invitrogen, 21985-023) 500 μ lおよび56度で20分間熱処理して非働化した牛胎児血清(三光純薬, No.3308-502) 50 mlを添加したものをいう(以下、同じ)。次に、当該細胞懸濁液を2 ml/wellずつ6 well細胞培養用プレート (Becton Dickinson Labware, 35-3046)に蒔き、CO₂ インキュベーターにて培養した。翌日、OPTI-MEM I (Invitrogen, 31985-062) 100 μ lにFugene 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics Corporation) 4 μ lおよびHRE-PLAPレポータープラスミド2 μ gを加え、室温にて15分間インキュベートした後、細胞の培養上清に添加し、CO₂ インキュベーターにて培養した。翌日、当該細胞をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし5 mlのRPMI培養液に懸濁した。径10 cmの細胞培養用シャーレ (Becton Dickinson Labware, 35-3003)に、RPMI培養液 11.2 mlおよび当該細胞懸濁液0.8 mlを添加して、CO₂ インキュベーターにて培養を継続した。翌日、G-418(Geneticin:Invitrogen)を最終濃度500 μ g/mlになるように培養上清に添加し、さらにCO₂ インキュベーターにて培養を継続した。500 μ g/ml のG-418を含むRPMI培養液は3日毎に交換した。G-418を添加して培養してから11日目に、当該プレート上に形成された細胞塊(コロニー)をそれぞれトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし24 well細胞培養用プレート (Becton Dickinson Labware, 35-3047)に移植しクローン化した。

[0136] 2. HRE-PLAPレポータープラスミド安定導入の確認

CO₂ インキュベーターにて培養を継続し、クローン化した細胞がコンフルエントになった時点で、トリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、PLAP測定用RPMI培養液 500 μ lにて懸濁した。ここで、PLAP測定用PRMI培養液とは、RPMI (SIGMA, R8758) 500 mlにPenicillin Streptomycin (Invitrogen, 15140-122) 5 ml、100 mM Pyruvate (Invitrogen, 11360-070) 5 ml、2-Mercaptoethanol (Invitrogen, 21985-023) 500 μ lおよび65度で20分間熱処理して血清中のPLAP活性を失活させた牛胎児血清(三光純薬, No.3308-502) 50 mlを添加した培養液をいう(以下、同じ)。次に、当該細胞懸濁

液を50 μ l/wellずつ384 well細胞培養用プレート (Greiner, 781182) 2枚にまいて、正常酸素濃度(21%)のCO₂ インキュベーターで培養した。翌日、1枚のプレートを、酸素濃度を2%に設定した低酸素インキュベーター(タバイエスベック、BNP110M)に移して培養した。もう1枚のプレートは正常酸素濃度のCO₂ インキュベーターで培養した。

翌日、培養上清中のPLAP活性を測定し、転写活性の指標とした。より具体的には、Lumi-Phos 530 (Lumigen, Inc.)とPLAP buffer(0.28 M Na₂CO₃-NaHCO₃ pH 10.0, 8 mM MgSO₄)を等量混和して基質溶液とした。次に、ELISA用ホワイトプレート(住友ベークライト株式会社、品番MS-8496W)に基質溶液100 μ lを添加し、ここに培養上清10 μ lを添加して、混和した。続いて、遮光して、室温で1時間インキュベートした後に、プレートリーダー(Perkin Elmer, ARVO)を用いて化学発光強度を測定した。各クローンについて、この過程を繰り返す、通常酸素濃度(21%)条件下に比べて低酸素濃度(2%)条件下において、より高いPLAP活性が誘導されるクローンA3(図3)を得た。以降、当該クローンA3をSK-OV-3/HRE-PLAP(A3)と記載する。

[0137] [実施例4] In vivoにおけるHRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞の転写活性測定(皮下移植)

1. マウスにおけるHRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞の移植および血液採取
500 μ g/mlのG-418を含むRPMI培養液で継代培養したSK-OV-3/HRE-PLAP(A3)(実施例3)をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、 5×10^7 cells/mlになるようにRPMI培養液にて懸濁した。100 μ lの細胞懸濁液(5×10^6 cells/mouse)をBALB/cヌードマウス(雌性、7週齢、日本クレアより購入)の皮下に、ツベルクリン用1 ml注射筒(26G針付)を用いて移植した。移植日を含め連日、ヘパリンコート・ヘマトクリット管(ドラモンド社製)を用いて眼窩採血を行った。ヘマトクリット管は専用パテ(テルモ社製)にて片端を閉じた。採血した血液は、ヘマトクリット管用遠心機(トミー精工、RC-24BN)にて10,000 rpm、2分間の遠心処理を行い、血漿画分を分離した。血漿は、生理食塩水で10倍に希釈して10倍希釈血漿とし、PLAP活性を測定するときまで-20℃にて凍結保存した。

また、移植したSK-OV-3/HRE-PLAP(A3)からなる腫瘍の大きさと血中PLAP活性の

関係を調べるため、腫瘍の短径(mm)および長径(mm)を電子デジタルノギスで計測し、以下に示す計算式により腫瘍体積を求めた。

$$\text{腫瘍体積(mm}^3\text{)} = \text{長径(mm)} \times \text{短径(mm)} \times \text{短径(mm)} / 2$$

[0138] 2. 血中PLAP活性の測定

10倍希釈血漿を室温で融解した後に、乾熱滅菌機(東京理科機械、WFO-600SD)で65℃、1時間熱処理して、内在性のアルカリフォスファターゼを不活化した。次に、熱処理後の10倍希釈血漿をPLAP buffer (0.28 M Na_2CO_3 - NaHCO_3 pH 10.0, 8 mM MgSO_4)で10倍に希釈して100倍希釈血漿とした。

一方、Lumi-Phos 530 (Lumigen, Inc.)とPLAP buffer (0.28 M Na_2CO_3 - NaHCO_3 pH 10.0, 8 mM MgSO_4)を等量混和して基質溶液とした。次に、ELISA用ホワイトプレート(住友ベークライト株式会社、品番MS-8496W)に基質溶液を100 μ l添加し、ここに100倍希釈血漿を10 μ l添加して、混和した。続いて、遮光して、室温で1時間インキュベートした後に、プレートリーダー(Perkin Elmer, ARVO)を用いて化学発光強度を測定し、血中PLAP活性の指標として用いた。

その結果、血中PLAP活性は、SK-OV-3/HRE-PLAP(A3)移植前には1000units以下だったが、移植翌日より上昇し、一度減少した後、SK-OV-3/HRE-PLAP(A3)からなる腫瘍増殖とともに再上昇するという二相性の変化を示した(図4)。移植直後には腫瘍内には血管が存在しないため、腫瘍内は低酸素となり、HREを介した転写活性が誘導され、HRE-PLAPレポータープラスミドの転写活性が亢進したために、血中PLAP活性が上昇したと考えられる。また、その後、血管新生が起こり、腫瘍内酸素濃度が上昇したために、HREを介した転写活性が抑制され、血中PLAP活性が減少し、その後、腫瘍細胞数の増加とともに血中PLAP活性が上昇したと考えられる。

以上の結果から、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルにおいて、生体液中の当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標とすることによって、非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写制御配列を介した転写活性を測定することができることが明らかになった。

[0139] [実施例5] dsRNA発現ベクタープラスミドの調製

HREを介した転写調節においては、転写因子HIF-1がHREに結合することにより転写が活性化されることが知られている(Harris (2002) Nature Reviews Cancer, 2:38-47)。転写因子HIF-1はHIF-1 α とHIF-1 β のヘテロダイマーである(Harris (2002) Nature Reviews Cancer, 2: 38-47)。実施例4で認められた血中PLAP活性がHIF-1に依存した生理的なものであるか確認するために、HIF-1 α -dsRNA発現ベクタープラスミドを作製した。

ここで、dsRNAとは、double strand RNAのことであり、RNA干渉(Fire, et. al. (1998) Nature, 391:806-811、以下、RNAiと称する場合がある)を引き起こす二本鎖RNAをいう。

以下、詳細に説明する。

[0140] 1. ヒトゲノムDNAからのヒトH1プロモーターのクローニング

ヒトゲノムDNA (Roche Diagnostics Corporation)を鋳型とし、配列番号:32および配列番号:33で示したオリゴDNA(インビトロジェン株式会社に依頼して作製した)をプライマーとして、Pfuポリメラーゼ(Promega)を用い、(95°C 30秒、60°C 30秒、72°C 3分)を35回繰り返すことによりPCR反応を行って、ヒトH1プロモーターからなるDNA断片を増幅した。

プライマー:ACAGAATTCGAACGCTGACGTCATCA (配列番号:32)

プライマー:GAAAGCTTGGTAGATCTGTGGTCTCATAACAGAACTTATAAGAT (配列番号:33)

当該DNA断片をEcoRIおよびHindIIIで切断し、あらかじめEcoRIおよびHindIIIで切断しておいたpUC18(東洋紡績株式会社)にリガーゼ反応により挿入した。常法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems)により配列を確認し、pUC18/H1プロモーターを得た。

[0141] 2. dsRNA発現ベクタープラスミドの作製

配列番号:34および配列番号:35で示したオリゴDNAを作製し(インビトロジェン株式会社に依頼)、それぞれ100 μ M になるようにTEバッファー(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA)で溶解した。この100 μ MのオリゴDNA溶液を25 μ lずつ混和して

、90℃で2分間熱した後に、37℃ 1時間、室温 1時間で冷却することでアニーリングさせ、両端にそれぞれXbaIおよびEcoRIサイトを持つリンカーDNA断片を得た。オリゴDNAの塩基配列は以下のとおりである。

オリゴDNA:CTAGAGGTACCAGCTGCTAGCG (配列番号:34)

オリゴDNA:AATTCGCTAGCAGCTGGTACCT (配列番号:35)

pUC18/H1プロモーターをEcoRIおよびHindIIIで切断し、H1プロモーター断片を得た。当該H1プロモーター断片と当該リンカーDNA断片とをあらかじめXbaIおよびHindIIIで切断したpREP7 (Invitrogen) にリガーゼ反応により挿入した。常法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems)により配列を確認し、dsRNA発現ベクタープラスミドpREP-H1 (図5)を得た。

[0142] [実施例6] HIF-1 α dsRNA発現ベクタープラスミドの調製

配列番号:36に示したHIF-1 α mRNAの部分配列をもとに配列番号:37および配列番号:38で示したオリゴDNAを作製し(インビトロジェン株式会社に依頼)、それぞれ100 μ M になるようにTEバッファー(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA)で溶解した。この100 μ MのオリゴDNA溶液を25 μ lずつ混和して、90℃で2分間熱した後に、37℃ 1時間、室温 1時間で冷却することでアニーリングさせ、HIF-1 α dsRNA発現用DNA断片を得た。RNAおよびオリゴDNAの塩基配列は以下のとおりである。

mRNA配列:GAUAAGUUCUGAACGUCGA (配列番号36)

オリゴDNA:

GATCCCCGATAAGTTCTGAACGTCGATTCAAGAGATCGACGTTTCAGAACTTA
TCTTTTTTGAAA(配列番号37)

オリゴDNA:

AGCTTTTCCAAAAAGATAAGTTCTGAACGTCGATCTCTTGAATCGACGTTCA
GAACTTATCGGG(配列番号38)

実施例5で得られたpREP-H1を、BglIIとHindIIIで切断し、当該HIF-1 α dsRNA発現用DNA断片をリガーゼ反応 (TAKARA, Cat.6022) により挿入した。常法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌か

らプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems)により配列を確認し、HIF-1 α dsRNA発現ベクタープラスミドpREP-H1-HIF1RNAi(図6)を得た。

[0143] [実施例7] HIF-1 α dsRNA発現ベクタープラスミド安定導入細胞の調製

実施例3で得たHRE-PLAPレポータープラスミド安定導入細胞SK-OV-3/HRE-PLAP(A3)に実施例6で得たHIF-1 α dsRNA発現ベクタープラスミドpREP-H1-HIF1RNAiをトランスフェクションして、安定導入細胞をクローン化した。以下、詳細に記載する。

[0144] 1. SK-OV-3/HRE-PLAP(A3)へのpREP-H1-HIF1RNAiの導入

500 μ g/mlのG-418を含むRPMI培養液で継代培養したSK-OV-3/HRE-PLAP(A3)を回収し、RPMI培養液を用いて 2.5×10^5 cells/mlになるように懸濁した。次に、当該細胞懸濁液を2 ml/wellずつ6 well細胞培養用プレート(Becton Dickinson Labware, 35-3046)に蒔き、CO₂ インキュベーターにて培養した。翌日(2日目)、OPTI-MEM I (Invitrogen, 31985-062) 100 μ lにFugene 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics Corporation) 4 μ lおよびpREP-H1-HIF1RNAi 2 μ gを加え、室温にて15分間インキュベートした後、細胞の培養上清に添加し、CO₂ インキュベーターにて培養した。4日目に、トランスフェクションした細胞をトリプシン-EDTA処理して回収し、RPMI培養液5 mlに懸濁した。径10 cmの細胞培養用シャーレ(Becton Dickinson Labware, 35-3003)に、RPMI培養液 11.5 mlおよび当該懸濁液 0.5 mlを添加して、CO₂ インキュベーターにて培養を継続した。7日目に、ハイグロマイシンB (Invitrogen)を最終濃度200 μ g/mlになるようにRPMI培養上清に添加し、CO₂ インキュベーターにて培養を継続した。200 μ g/mlのハイグロマイシンBを含む培養液は3日毎に交換した。21日目以降、当該プレート上に形成された細胞塊(コロニー)をそれぞれトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし24 well細胞培養用プレート(Becton Dickinson Labware, 35-3047)に移植しクローン化した。

[0145] 2. pREP-H1-HIF1RNAiの安定導入の確認

CO₂ インキュベーターにて培養を継続し、単離されたそれぞれのクローンが十分量増殖し、コンフルエントになった時点で、一部を96 well細胞培養用プレート(Corning,

3628)に蒔きなおし、2%低酸素下で一晩培養し、培養上清のPLAP活性を測定した。それぞれのクローンについて、この過程を繰り返し、2%低酸素下でのPLAP活性が低いクローン2D4を得た(図7)。一方、上記方法と同様にSK-OV-3/HRE-PLAP(A3)にpREP-H1をトランスフェクションして、クローニングして、クローンMD2を得た(図7)。

- [0146] 前項で得た各クローンにおいてRNAi効果によりHIF-1 α mRNAが減少しているか調べるために、各クローンから全RNAをRNA抽出キットRNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて調製し、リアルタイムPCR解析を行いHIF-1 α のmRNA量を定量した。より具体的には、TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems社、N808-0234)を用いて450 ngのRNAをRandom Hexamersプライマーを用いて50 μ lの反応液中でcDNAに逆転写した。反応終了後、反応液を蒸留水で3倍に薄めてcDNA溶液とした。cDNA溶液 10 μ lにTaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems社、4304437) 12.5 μ l, HIF-1 α 用20X Assay-on-Demand™ Gene Expression Assay Mix (Applied Biosystems社、4331182, Hs00153153_m1)または β -actin用アッセイミックス(Applied Biosystems社、4310881E) 1.25 μ l, 蒸留水1.25 μ lを添加し、ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems)によってリアルタイムPCRを行い、Comparative Ct法(Applied Biosystems Prism 7700 Users Bulletin No.2)によって結果を解析してHIF-1 α mRNAおよび β -actin mRNA量を定量した。求めたHIF-1 α mRNA量を β -actin mRNA量で除して補正した。

この結果、pREP-H1-HIF1RNAiをトランスフェクションしたクローン2D4では、RNAiを引き起こす配列を含まずベクターのみのpREP-H1をトランスフェクションしたクローンMD2に比べて、HIF-1 α mRNAの発現が95%以上抑制されていることが確認されたので(図8)、以降の実験に用いることとした。

- [0147] [実施例8] RNAiによるHIF-1 α の抑制が、in vivoにおけるHRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞の転写活性に及ぼす影響

500 μ g/mlのG-418および200 μ g/mlのハイグロマイシンBを含むRPMI培養液で継代培養したクローン2D4およびクローンMD2(実施例7)をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、RPMI培養液を用いて 5×10^7 cells/mlになるように懸濁した。200 μ lの細胞懸濁液(2×10^6 cells/mouse)をBALB/cヌードマウス CD-1ヌードマウス(雌

性、9週齢、日本チャールズリバーより購入)の皮下に、ツベルクリン用1 ml注射筒(26G針付)を用いて移植した。移植日を含め連日、ヘパリンコート・ヘマトクリット管(ドラモンド社製)を用いて眼窩採血を行った。ヘマトクリット管は専用パテ(テルモ社製)にて片端を閉じた。採血した血液は、ヘマトクリット管用遠心機にて10,000 rpm、2分間の遠心処理を行い、血漿画分を分離した。血漿は、生理食塩水で10倍に希釈して10倍希釈血漿とし、PLAP活性測定まで -20°C にて凍結保存した。クローン2D4およびクローンMD2からなる腫瘍体積の測定と血漿中PLAP活性の測定は実施例4に示した方法で行った。

その結果、コントロールのクローンMD2では移植直後血中PLAP活性が上昇したが、RNAiによってHIF-1 α の発現を抑制したクローン2D4では移植直後の血中PLAP活性の上昇が抑制されていた(図9)。よって、実施例4で認められたHRE-PLAPレポータープラスミドによる血中PLAP活性の上昇はHIF-1に依存したものであることが示された。よって、PLAP活性は、転写制御配列の転写活性を反映したものであり、PLAP活性を測定することで、転写制御配列の転写活性測定することができることが明らかになった。

[0148] [実施例9]抗VEGF抗体の投与による、in vivoにおけるHRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞の転写活性に及ぼす影響

非ヒト動物モデルにおいて、血中PLAP活性を測定することで移植した細胞中の転写活性を測定できることを確認するために、以下の実験を行った。

0.5%以上の酸素濃度では、酸素濃度が下がるほどHIF-1量が増加することが報告されている(Jiang, et. al. (1996) Am. J. Physiol, 271:C1172-C1180)。一方、抗VEGF抗体投与により血管新生が阻害され、腫瘍内酸素濃度が低下すると考えられる(Blagosklonny (2004) Cancer Cell, 5:13-17)。そこで、in vivoにおいて、HRE-PLAPの転写活性が腫瘍内の酸素濃度低下により誘導されることを、血中PLAP活性を指標にすることで測定できるかどうかを調べるために、HRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞を皮下移植したヌードマウスに、抗VEGF抗体を投与して、血中PLAP活性の経時変化を調べた。

[0149] より具体的には、500 $\mu\text{g/ml}$ のG-418を含むRPMI培養液で継代培養した

SK-OV-3/HRE-PLAP(A3)(実施例3)をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、RPMI培養液を用いて 5×10^7 cells/mlとなるように懸濁した。次に、100 μ lの細胞懸濁液(5×10^6 cells/mouse)をBALB/cヌードマウス(雌性、7週齢、日本クレアより購入)の皮下に、ツベルクリン用1 ml注射筒(26G針付)を用いて移植した。移植10日後より4日毎に抗VEGF抗体(R&D社、MAb293)100 μ g/headを静脈内投与した。投与開始日より、ヘパリンコート・ヘマトクリット管(ドラモンド社製)を用いて眼窩採血を行った。ヘマトクリット管は専用パテ(テルモ社製)にて片端を閉じた。採血した血液は、ヘマトクリット管用遠心機にて10,000 rpm、2分間の遠心処理を行い、血漿画分を分離した。血漿は、生理食塩水で10倍に希釈して10倍希釈血漿とし、PLAP活性測定まで -20°C にて凍結保存した。SK-OV-3/HRE-PLAP(A3)からなる腫瘍体積の測定と血漿中PLAP活性の測定は実施例4に示した方法で行った。

- [0150] その結果、抗VEGF抗体投与群(5匹)の腫瘍体積がコントロール群(5匹)と差がなかったにもかかわらず、抗VEGF抗体投与群の血中PLAP活性はコントロール群よりも高値であった(図10)。抗VEGF抗体投与により血管新生が阻害され、腫瘍内酸素濃度が低下すると考えられるが、この腫瘍内酸素濃度の低下に応答してHRE-PLAPの転写活性が上昇した結果、血中PLAP活性が増加したと考えられる。よって、この非ヒト動物モデルでは血中PLAP活性をモニターすることで、細胞内の酸素濃度をモニターすることが可能であると考えられる。

以上の結果からも、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルにおいて、生体液中の当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標とすることによって、非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写制御配列を介した転写活性を測定することができることが明らかになった。

- [0151] [実施例10] In vivoにおけるHRE-PLAPレポータープラスミド導入細胞の転写活性測定(腹腔内移植)

500 μ g/mlのG-418を含むRPMI培養液で継代培養したSK-OV-3/HRE-PLAP(A3)(実施例3)をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、RPMI培養液を用いて 1×10^7 cells/mlになるように懸濁した。200 μ lの細胞懸濁液(2×10^6 cells/mouse)を

BALB/cヌードマウス(雌性、7週齢、日本チャールズリバーより購入)の腹腔内に、ツベルクリン用1 ml注射筒(26G針付)を用いて移植した。移植日を含め連日、ヘパリンコート・ヘマトクリット管(ドラモンド社製)を用いて眼窩採血を行った。ヘマトクリット管は専用パテ(テルモ社製)にて片端を閉じた。採血した血液は、ヘマトクリット管用遠心機にて10,000 rpm、2分間の遠心処理を行い、血漿画分を分離した。血漿は、生理食塩水で10倍に希釈して10倍希釈血漿とし、PLAP活性測定まで -20°C にて凍結保存した。SK-OV-3/HRE-PLAP(A3)からなる腫瘍体積の測定と血漿中PLAP活性の測定は実施例4に示した方法で行った。

- [0152] その結果、血中PLAP活性は、皮下移植実験(実施例4)と同様に、腫瘍細胞移植前には1000units以下だったが、移植翌日より上昇し、一度減少した後に再上昇するという二相性の変化を示した(図11)。5匹中2匹はPLAPの上昇が遅くこれは腫瘍の生着率によると考えられる。

以上の結果からも、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルにおいて、生体液中の当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標とすることによって、非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写制御配列を介した転写活性を測定することができることが明らかになった。

また、移植部位は、皮下のみならず腹腔内でも可能であることが示された。

- [0153] [実施例11] In vivoにおけるVEGF-PLAPレポータープラスミド導入細胞の転写活性測定(頭蓋内移植)

PLAP basicベクタープラスミドのKpnI / NheIサイトにVEGF遺伝子のプロモーター配列からなるポリヌクレオチドを挿入したVEGF-PLAPレポータープラスミド(図12)をヒト脳腫瘍株U-251(理化学研究所細胞バンク、RCB0461)に安定導入したU251/VEGF-PLAP(Mizui, et. al. (2004) The Journal of antibiotics, 57: 188-196)をマウスの頭蓋内に移植し、血中PLAP活性を測定した。より具体的には、 $500\text{ }\mu\text{g/ml}$ のG-418を含むRPMI培養液で継代培養したU251/VEGF-PLAPをトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、2%メチルセルロースを用いて $1 \times 10^7\text{ cells/ml}$ になるように懸濁した。 $10\text{ }\mu\text{l}$ の細胞懸濁液($1 \times 10^5\text{ cells/mouse}$)をBALB/cヌードマウス(雌性、

12週齢、日本チャールズリバーより購入、10 mg/mlケタミン・13.4 mg/ml キシラジン・6.4 ug/ml アセプロマジン溶液を70 ul / headの0. 1ml腹腔内投与により麻酔)の頭蓋下に、25 μ lハミルトンシリンジを用いて移植した。移植日を含め連日、ヘパリンコート・ヘマトクリット管(ドラモンド社製)を用いて眼窩採血を行った。ヘマトクリット管は専用パテ(テルモ社製)にて片端を閉じた。採血した血液は、ヘマトクリット管用遠心機にて10,000 rpm、2分間の遠心処理を行い、血漿画分を分離した。血漿は、生理食塩水で10倍に希釈して10倍希釈血漿とし、PLAP活性測定まで-20℃にて凍結保存した。U251/VEGF-PLAPからなる腫瘍体積の測定と血漿中PLAP活性の測定は実施例4に示した方法で行った。

その結果、血中PLAP活性は、HRE-PLAPレポータープラスミドを導入したSK-OV-3を皮下移植した場合(実施例4)と同様に、腫瘍細胞移植前には1000 units以下だったが、移植翌日より上昇し、一度減少した後には再上昇するという二相性の変化を示した(図13)。

[0154] 以上の結果からも、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルにおいて、生体液中の当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標とすることによって、非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写制御配列を介した転写活性を測定することができることが明らかになった。

また、移植部位は、皮下のみならず頭蓋内でも可能であることが示された。

さらには、転写制御配列は、HREに限定されないことが示された。

[0155] 次に、HREとは異なる転写制御因子結合配列を有するプロモーターにおいても、移植細胞中の転写活性を測定できること確認するために、以下の実験を行った。

IL-4は、細胞表面にあるIL-4Rを介してSTAT6を活性化し、STAT6のホモダイマーを形成させることが知られている(Jinzhaou Hou, et. Al. (1994), Science, vol265 (16):1701-1706)。また、STAT6は、ホモダイマーを形成することによって、エンハンサーであるIL4RE(Richard Moriggl, et. al. (1997) Molecular and cellular Biology, vol17:3663-3678)に結合し、転写活性を調節することが知られている(Helen Kotanides, et. Al. (1996), The Journal of Biological Chemistry,

vol.271(41):25555-25561)。

そこで、非ヒト動物モデルにおいて、血中PLAP活性を測定することで移植した細胞中の転写活性を測定できることを確認するために、以下の実験を行った。

[0156] [実施例12]STAT6-PLAP レポータープラスミドの作製

HIV-1 kB-PLAPベクタープラスミド(MOLECULAR PHARMACOLOGY, 49:860-873 (1996))を制限酵素Spe IおよびXba Iで消化した。次に、アルカリフォスファターゼ(TaKaRa, 2120B)にて脱リン酸化した後、アガロースゲルにて電気泳動を行った。電気泳動後、当該アガロースゲルから約5.5 kbpのバンドを切り出し、「SUPREC-01」(TaKaRa, 9040)を用いてDNAフラグメントを抽出し、これをTK-PLAPベクターフラグメントとした。

[0157] 次に、Cellular Retinoid Binding Protein 2(以下、CRBP2と称する場合がある)のプロモーター領域にあるRXRが結合するDNA領域を、前述のTK-PLAPベクターフラグメントに挿入した。より具体的には、配列番号:39および配列番号:40に示したオリゴDNA(株式会社日本バイオサービスに依頼)をT4ポリヌクレオチドキナーゼ(TOYOBO, PNK-103)で処理した後、0.1M NaClとなるようにNaClを加え、65℃、10分の後、室温にて冷却し、アニーリングさせた。次に、TK-PLAPベクターフラグメントに当該オリゴDNAをリガーゼ反応(タカラバイオ株式会社、Cat.6022)により挿入した。常法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems)により配列を確認し、pCRBP2x2-tkPLAPベクターを得た(図14)。

オリゴDNA:CTAGTCAGGTCACAGGTCACAGGTCACAGTTCAAT(配列番号:39)

オリゴDNA:CTAGATTGAACTGTGACCTGTGACCTGTGACCTGA(配列番号:40)

次に、pCRBP2x2-tkPLAPベクターからCRBP2x2-TK promoter部位を切り出した。より具体的には、pCRBP2x2-tkPLAPベクターを制限酵素Spe IおよびHind IIIで消化し、アガロースゲルにて電気泳動を行った。電気泳動後、当該アガロースゲルから約200bpのバンドを切り出し、「SUPREC-01」(TaKaRa, 9040)を用いてDNAフラグメント

にて抽出し、これをCRBP2x2-TK promoterフラグメントとした。次に、制限酵素Nhe I およびHind IIIで消化したPLAP basicベクターに、CRBP2x2-TK promoterフラグメントをリガーゼ反応(タカラバイオ株式会社、Cat.6022)により挿入した。常法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems)により配列を確認し、pCRBP2x2-TK promoter-PLAP basicベクターを得た(図15)。

[0158] 続いて、pCRBP2x2-TK promoter-PLAP basicベクターのpCRBP2x2部分を除いて、IL4REのオリゴDNAを挿入してSTAT6-PLAP レポータープラスミドを得た。より具体的には、配列番号:41および配列番号:42で示したオリゴDNAを作製し(Pharmacia biotechに依頼)、それぞれ100 μ MになるようにTEバッファー(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA)で溶解した。この100 μ MのオリゴDNA溶液を25 μ lずつ混和して、95°Cで10分間熱した後、37°C 1時間、室温 1時間で冷却してオリゴDNAをアニーリングさせ、IL4REオリゴDNAを得た。オリゴDNAの塩基配列は以下のとおりである。

オリゴDNA:

AGCGGTACCTCGACTTCCCAAGAACAGAATCGACTTCCCAAGAACAGAATC
GACTTCCCAAGAACAGAATCTAGAGCT(配列番号:41)

オリゴDNA:

AGCTCTAGATTCTGTTCTTGGGAAGTCGATTCTGTTCTTGGGAAGTCGATTC
TGTTCTTGGGAAGTCGAGGTACCGCT(配列番号:42)

IL4REオリゴDNAを制限酵素KpnIおよびXbaIにて消化した。

次に、pCRBP2x2-TK promoter-PLAP basicベクターを制限酵素KpnIおよびXbaIにて消化し、アガロースゲルにて電気泳動を行った。電気泳動後、当該アガロースゲルから約6.9kbpのバンドを切り出し、「SUPREC-01」(TaKaRa, 9040)を用いてDNAフラグメントにて抽出し、これをTK promoter-PLAP basicベクターフラグメントとした。次に、当該TK promoter-PLAP basicベクターフラグメントに、制限酵素KpnIおよびXbaIにて消化したIL4REオリゴDNAをリガーゼ反応(タカラバイオ株式会社、Cat.6022)により挿入した。常法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit

(Applied Biosystems)により配列を確認し、STAT6-PLAPレポータープラスミドを得た(図16)。

[0159] [実施例13]STAT6発現 ベクタープラスミドの作製

ヒト末梢血単核球細胞をヒト健常人血液より調製し、Rneasy kit(QIAGEN社)にてRNAを抽出した。次に、TAKARA RNA LA PCR kit (TAKARA)を用いて、当該キットの操作方法にしたがいで逆転写反応(42℃ 45分、99℃ 5分)を行い、cDNAを得た。

次に、ヒトSTAT6遺伝子をクローニングするために、上記操作で得たcDNAを鋳型にしてTAKARA LA PCR kitおよび配列番号:43および配列番号:44で示したオリゴDNA(日本バイオサービスより購入)を用いてPCR反応を行った。PCR条件は、94℃ 5分の反応を行った後、98℃ 1分、60℃ 1分、73℃ 3分の反応を30サイクル行った後、73℃ 10分反応を行い、伸張反応を完全に行った。プライマーの配列は、以下の通りである。

プライマー:CGGAATTCATGTCTCTGTGGGGTCTGGTCTCCA(配列番号:43)

プライマー:GCTCTAGATCACCAACTGGGGTTGGCCCTTAGG(配列番号:44)

続いて、当該PCR産物を制限酵素EcoRIおよびXbaIで消化し、同じく制限酵素EcoRIおよびXbaIで消化したpBlescript SK(+)プラスミド(TOYOBO)にリガーゼ反応(タカラバイオ株式会社、Cat.6022)により挿入した。常法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems)により配列を確認し、pBlescript SK(+)/STAT6プラスミドを得た。

次に、常法により、pBlescript SK(+)/STAT6プラスミドを制限酵素EcoRIおよびXbaIで消化しSTAT6遺伝子を切り出し、制限酵素EcoRIおよびXbaIで消化したpcDNA3.1(+)プラスミド(Invitrogen)にリガーゼ反応(タカラバイオ株式会社、Cat.6022)により挿入した。常法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems)により配列を確認し、STAT6発現 ベクタープラスミドを得た(図17)。

[0160] [実施例14]STAT6-PLAP レポータープラスミドおよびSTAT6発現 ベクタープラスミ

ド安定導入細胞の作製

実施例12および13で得たSTAT6-PLAP レポータープラスミドおよびSTAT6発現ベクタープラスミドをヒト胎児腎臓細胞HEK293細胞(ATCC1573)に導入し、IL4によるPLAP発現誘導率の高いクローンをクローニングした。以下詳細に記載する。

DMEM培養液で継代培養したHEK293細胞を回収し、DMEM培養液を用いて 1.0×10^5 cells/mlになるように懸濁した。ここで、DMEM培養液とは、DMEM (SIGMA, D6429) 500 mlにPenicillin Streptomycin (Invitrogen, 15140-122) 5 mlおよび56度で20分間熱処理して非働化した牛胎児血清 50 mlを添加したものをいう(以下同じ)。

次に、当該細胞懸濁液を3 ml/wellずつ6 well細胞培養用プレート (Becton Dickinson Labware, 35-3046)に蒔き、CO₂ インキュベーターにて培養した。翌日、OPTI-MEM I (Invitrogen, 31985-062) 溶液で細胞を洗浄し、1.5mlのOPTI-MEM I 溶液を加えた。OPTI-MEM I溶液274 μ lに500 μ g/mlのSTAT6-PLAP レポータープラスミドおよび500 μ g/mlのSTAT6発現 ベクタープラスミドを3 μ lずつ添加した。その後Lipofectamine (Invitrogen, 18324-012) 溶液20 μ lを加え、室温で20分間インキュベートした。次に、1.2mlのOPTI-MEM I溶液を加え、計1.5mlの溶液を細胞の培養上清に添加し、CO₂ インキュベーターにて2時間培養した。最終濃度が20% となるようにFCSを加えたDMEM培養液1.5mlを細胞培養液に加え、さらにCO₂ インキュベーターにて培養した。翌日、当該細胞をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、G-418(Geneticin:Invitrogen)が最終濃度1mg/ml含まれているDMEM培養液に5 cells/mlとなるように細胞を懸濁し、200 μ lづつ1個/wellとなるように96well細胞用培養プレート(Becton Dickinson Labware, 35-3072)に細胞を蒔き、STAT6-PLAP レポータープラスミドおよびSTAT6発現 ベクタープラスミド安定導入クローン化細胞を選択した。

- [0161] 次に、クローン化した細胞がIL4の刺激によりPLAP活性が上昇するか否かを検討した。より具体的には、クローン化した細胞を、トリプシン-EDTA処理して器壁からはがしDMEM培養液に懸濁し、 1.0×10^4 cells/190 μ l/wellとなるように96well細胞用培養プレートに細胞を蒔いた。翌日、ヒトIL4(カルビオケム、407635)を最終濃度が1ng/mlとなるように20ng/mlのヒトIL4を10 μ l細胞培養液に添加した。翌日、培養上清を回収

し、培養上清中のPLAP活性を測定した。

より具体的には、ELISA用ブラックプレート(住友ベークライト株式会社、品番MS-8496K)にPLAP buffer ($0.28 \text{ M Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ pH 10.0, 8 mM MgSO_4)を $100 \mu\text{l}$ 添加し、そこに 65°C の湯浴中で10分間処理した培養上清を $10 \mu\text{l}$ 添加した。ここにLumi-Phos 530 (Lumigen, Inc.) $50 \mu\text{l}$ 添加し、混和した。続いて、遮光して、室温で1時間インキュベートした後に、プレートリーダー(Perkin Elmer, ARVO)を用いて化学発光強度を測定した。その結果、図18に示すとおりIL4刺激により非刺激条件に比べ高いPLAP活性を誘導するクローンを得た。以降、当該クローンをE9細胞と記述する。

[0162] [実施例15]E9細胞導入によるマウス空気嚢(Air pouch)モデルの作製

5% cytodex3 (Amersham Bioscience, 17-0485-01)溶液および2% カルボキシメチルセルロース(以下、CMCと称する場合がある)溶液(第一工業製薬株式会社)を調製した。より具体的には、5 gのcytodex3を100 mlのPBS(SIGMA, R8537)で懸濁し、オートクレーブにより滅菌操作を行った。また、2%CMC溶液は、100 mlのPBSにスターラーバーで攪拌しながらCMCを2 g加え、その後オートクレーブにより滅菌操作を行い調製した。

次に、E9細胞をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、 $1.0 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ となるようにDMEM培養液に細胞を懸濁した。 $1.0 \times 10^7 \text{ cells}$ のE9細胞に対し0.2 gのcytodex3を混和した。より具体的には、 $1.0 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ の細胞懸濁液10 mlに対し、4 mlの5% cytodex3溶液を混和した。次に、細胞/cytodex3懸濁液をnon-tissue culture plate (IWAKI, SH90-15)に蒔き、 CO_2 インキュベーターにて培養した。翌日、細胞を回収し、遠心操作を行い、上清を除いた。 $2.0 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ となるようにDMEM培養液を加え、さらに等量の2%CMC溶液を加え、細胞濃度が $1.0 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 、CMCの最終濃度が1%となるように細胞を調製した。

[0163] ジエチルエーテル(WAKO, 055-01155)麻酔下にて、CDF1マウス(日本チャールズリバー)に27G針付き5 mlのテルモシリンジでマウスの背部皮下に3 ml空気をいれ、空気嚢を作成した。次に、細胞懸濁液2mlを22G針付きシリンジにて空気嚢内に移入した。具体的には、マウス一匹あたり $2.0 \times 10^6 \text{ cells}$ の細胞を移入した。次に、1%

CMCで3 ng/mlとなるように調製したヒトIL4(カルビオケム、407635)1 mlを22G針付きシリンジにてマウスの空気嚢内に移入し、よく混和した。24時間後、ヘパリン処理済みのテルモヘマトクリット毛細管(TERUMO, VC-H075H)を用いて眼窩採血を行った。採血した血液は、遠心機にて3,000回転、10分間遠心分離を行い、血漿画分を得た。内在性のアルカリフォスファターゼを失活させるために、血漿サンプルを65℃の湯浴中で10分間処理し、血漿中のE9細胞由来のPLAP活性を測定した。より具体的には、ELISA用ブラックプレート(住友ベークライト株式会社、品番MS-8496K)にPLAP buffer ($0.28 \text{ M Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ pH 10.0, 8 mM MgSO_4)を40 μl 添加し、血漿サンプル10 μl を添加した。ここにLumi-Phos 530 (Lumigen, Inc.)50 μl を添加して、混和した。続いて、遮光して、室温で1時間インキュベートした後に、プレートリーダー(Perkin Elmer, ARVO)を用いて化学発光強度を測定した。その結果、IL4刺激により、血中に分泌されたPLAP活性が顕著に上昇することを検出することができた(図19)。

[0164] 以上の結果から、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植し、当該非ヒト動物モデルにおける分泌タンパク質量を測定することにより、非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性を測定することができることが明らかになった。

また、移植において、担体を用いることも可能であることが示された。

さらには、転写制御配列は、特定の配列に限定されないことが示された。

また、腫瘍細胞のみならず、不死化細胞でも可能であることが示された。

[0165] [実施例16]E9細胞導入によるマウス空気嚢(Air pouch)モデルでの阻害作用試験
非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングできるか否かを検討するため、in vitroにおいて、IL4刺激によるSTAT6活性化を介した転写活性を阻害することが知られている化合物2-(6-[3-(4-フルオロフェニル)-1H-4-ピラゾリル]イミダゾ[1,2-a]ピリジン-3-イル)-1,3-チアゾール・3塩酸塩(国際公開第02/088107号パンフレット)を用いて実験を行った。

[0166] 5% cytodex3 (Amersham Bioscience, 17-0485-01)溶液および2% CMC溶液(第一工業製薬株式会社)を調製した。より具体的には、5 gのcytodex3を100 mlのPBS(SIGMA, R8537)で懸濁し、オートクレーブにより滅菌操作を行った。また、2%CMC溶液は、100 mlのPBSにスターラーバーで攪拌しながらCMCを2 g加え、その後オートク

レーブにより滅菌操作を行い調製した。

次に、E9細胞をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、 1.0×10^6 cells/mlとなるようにDMEM培養液に細胞を懸濁した。 1.0×10^7 cellsのE9細胞に対し0.2 gのcytodex3を混和した。より具体的には、 1.0×10^6 cells/mlの細胞懸濁液10 mlに対し、4 mlの5% cytodex3溶液を混和した。次に、細胞/cytodex3懸濁液をnon-tissue culture plate (IWAKI, SH90-15)に蒔き、CO₂ インキュベーターにて培養した。翌日、細胞を回収し、遠心操作を行い、上清を除いた。 2.0×10^6 cells/ml となるようにDMEM培養液を加え、さらに等量の2%CMC溶液を加え、細胞濃度が 1.0×10^6 cells/ml、CMCの最終濃度が1%となるように細胞を調製した。

[0167] ジエチルエーテル(WAKO, 055-01155)麻酔下にて、CDF1マウス(日本チャールズリバー)に27G針付き5mlのテルモシリンジでマウスの背部皮下に3 ml空気をいれ、空気嚢を作成した。次に、細胞懸濁液2 mlを22G針付きシリンジにて空気嚢内に移入した。具体的には、マウス一匹あたり 2.0×10^6 cellsの細胞を移入した。

次に、2-(6-[3-(4-フルオロフェニル)-1H-4-ピラゾリル]イミダゾ[1,2-a]ピリジン-3-イル)-1,3-チアゾール・3塩酸塩(国際公開第02/088107号パンフレットに記載された製造方法に準じて製造)を0.5%メチルセルロース(和光純薬工業)水溶液にメノウ鉢を用いて懸濁した。この被検化合物溶液を、20 mg/kgで経口投与した。一方、対照群には0.5%メチルセルロース水溶液を投与した。

投与1時間後に1% CMCで3 ng/mlとなるように調製したヒトIL4(カルビオケム、407635) 1 mlを22G針付きシリンジにてマウスの空気嚢内に移入し、よく混和した。

24時間後、ヘパリン処理済みのテルモヘマトクリット毛細管(TERUMO, VC-H075H)を用いて眼窩採血を行った。採血した血液は、遠心機にて3,000回転、10分間遠心分離を行い、血漿画分を得た。内在性のアルカリフォスファターゼを失活させるために、血漿サンプルを65℃の湯浴中で10分間処理し、血漿中のE9細胞由来のPLAP活性を測定した。より具体的には、ELISA用ブラックプレート(住友ベークライト株式会社、品番MS-8496K)にPLAP buffer ($0.28 \text{ M Na}_2\text{CO}_3$ - NaHCO_3 pH 10.0, 8 mM MgSO_4)を40 μ l添加し、血漿サンプル10 μ lを添加した。ここにLumi-Phos 530 (Lumigen, Inc.)50 μ lを添加して、混和した。続いて、遮光して、室温で1時間インキュベートした。

後に、プレートリーダー (Perkin Elmer, ARVO) を用いて化学発光強度を測定した。その結果、被検化合物は、対象群と比較してIL4刺激により活性化されたPLAP活性を94.1%抑制した(図20)。

[0168] したがって、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルに化合物を投与し、生体液中の当該分泌タンパク質量を測定し、分泌タンパク質量を変化させる化合物を選択することによって、非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングできることが明らかになった。

[0169] [実施例17]SV40-PLAPレポータープラスミドの作製

PLAP basicベクタープラスミドのKpn I / Hind IIIサイトにSV40プロモーターからなるポリヌクレオチドを挿入し、SV40-PLAPレポータープラスミドを得た。より具体的には、まず、pSEAP controlレポータープラスミド (Clontech) をBgl IIおよびMlu Iで切断した後に、当該切断末端をブランディング反応 (タカラバイオ株式会社、Cat.6025) により平滑化した。次に、当該プラスミドをリガーゼ反応によりセルフライゲーションした。常法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems) により配列を確認した。次に、当該プラスミドをKpn IおよびHind IIIで切断し、SV40プロモーター断片を得た。当該SV40プロモーター断片を、あらかじめKpn IおよびHind IIIで切断したPLAP basicベクタープラスミドにリガーゼ反応により挿入した。常法により、当該プラスミドを大腸菌に導入し、形質転換させた。形質転換したいくつかの大腸菌からプラスミドを回収し、ABI prism DNA sequencing kit (Applied Biosystems) により配列を確認し、SV40-PLAPレポータープラスミド (図21) を得た。

[0170] [実施例18]SV40-PLAPレポータープラスミド安定導入細胞の作製

実施例12で得たSV40-PLAPレポータープラスミドをEffectone Reagent (QIAGEN, Cat. No. 301427) を用いて、ヒト胃癌細胞株MKN-45細胞に導入し、安定導入細胞をクローニングした。より具体的には、RPMI培養液で継代培養したMKN-45細胞 (JCRB細胞バンク、JCRB0254) を回収し、RPMI培養液を用いて 10×10^4 cells/mlになるように懸濁した。次に、当該細胞懸濁液を2 ml/wellずつ6 well細胞培養用プレート

(Becton Dickinson Labware, 35-3046)に蒔き、CO₂ インキュベーターにて培養した。翌日、SV40-PLAPレポータープラスミド2 μ gにEC buffer 200 μ lおよびEnhancer 16 μ lを加え、室温にて5分間インキュベートした後、当該DNA溶液にEffectone Reagent 20 μ lを加え、さらに、室温にて5分間インキュベートした。当該DNA溶液にRPMI培養液 964 μ lを加えて混和し、964 μ l / wellずつ細胞の培養上清に添加し、CO₂ インキュベーターにて培養した。翌日、当該細胞の培養上清を吸引除去して、新鮮なRPMI培養液2 mlを添加した。翌日、当該細胞をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、600 μ g/ml のG-418(Geneticin:Invitrogen)を含むRPMI培養液を用いて懸濁して、15 cm細胞培養用シャーレ(Becton Dickinson Labware, 35-3025)に蒔き、CO₂ インキュベーターにて培養を継続した。600 μ g/ml のG-418を含むRPMI培養液は4日毎に交換した。G-418を添加して培養してから14日目に、当該細胞をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、常法に従い限界希釈法にてクローン化し、MKN-45/SV40-PLAP(M1)を得た。

[0171] [実施例19] In vivoにおけるSV40-PLAPレポータープラスミド導入細胞の転写活性測定(皮下移植)

600 μ g/mlのG-418を含むRPMI培養液で継代培養したMKN-45/SV40-PLAP(M1)(実施例13)をトリプシン-EDTA処理して器壁からはがし、 5×10^7 cells/mlになるようにRPMI培養液にて懸濁した。100 μ lの細胞懸濁液(5×10^6 cells/mouse)をBALB/cヌードマウス(雌性、8週齢、日本チャールズリバーより購入)の皮下に、ツベルクリン用1 ml注射筒(26G針付)を用いて移植した。移植日を含め連日、ヘパリンコート・ヘマトクリット管(ドラモンド社製)を用いて眼窩採血を行った。ヘマトクリット管は専用パテ(テルモ社製)にて片端を閉じた。採血した血液は、ヘマトクリット管用遠心機にて10,000 rpm、2分間の遠心処理を行い、血漿画分を分離した。血漿は、生理食塩水で10倍に希釈して10倍希釈血漿とし、PLAP活性測定まで-20℃にて凍結保存した。MKN-45/SV40-PLAP(M1)からなる腫瘍体積の測定と血漿中PLAP活性の測定は実施例4に示した方法で行った。

[0172] その結果、血中PLAP活性は、MKN-45/SV40-PLAP(M1)移植前には1000units以下だったが、腫瘍体積の増加に伴って上昇した(図22)。血中PLAP活性の経時変化

は、腫瘍体積の経時変化とほぼ並行していた。従って、非ヒト動物モデルにおいて、血中PLAP活性を測定することにより、腫瘍細胞数を推定することが可能であることが明らかになった。

- [0173] 以上の結果から、分泌型タンパク質発現ベクター導入細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルにおいて、生体液中の当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標とすることによって、移植細胞数および腫瘍体積を測定できることが明らかになった。

産業上の利用の可能性

- [0174] 本発明により、非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写制御配列を介した転写活性を非侵襲的、簡便かつ精度よく測定する方法を確立し、定量的な評価が可能となった。

これにより、これまでの煩雑かつ定量性の低い評価方法では困難だった転写活性の経時的な変化をも測定することが可能となった。

- [0175] また、本発明により、非ヒト動物モデルにおいて、転写制御配列を介した転写活性に影響を与える化合物を非侵襲的、簡便かつ精度よくスクリーニングする方法を確立し、定量的な評価が可能となった。

- [0176] さらに、転写制御配列として恒常的転写制御配列を用いて、分泌型タンパク質発現ベクターが導入された細胞を非ヒト動物モデルに移植することによって得られた非ヒト動物モデルにおいて、生体液中の当該分泌タンパク質量を測定することにより、移植細胞数および腫瘍体積の測定ならびに移植細胞数および腫瘍体積に影響を与える化合物を非侵襲的、簡便かつ精度よくスクリーニングする方法を確立し、定量的な評価が可能となった。

これにより、これまでの評価方法では困難だった、癌細胞同所移植モデルにおける腫瘍体積の経時的変化を評価することが可能となった。

請求の範囲

- [1] 非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性を測定する方法であって、転写制御配列及びそれに機能的に結合された分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルにおいて、当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標として、転写制御配列を介した転写活性を測定する、前記方法。
- [2] 転写制御配列が、転写制御因子結合配列を含むものである、請求項1に記載の方法。
- [3] 転写制御因子結合配列が、配列番号:1、配列番号:2、配列番号:3、配列番号:4、配列番号:5、配列番号:6、配列番号:7および配列番号:8からなる群から選択される少なくとも一つの配列である、請求項2に記載の方法。
- [4] 分泌型タンパク質が、分泌型の酵素である請求項1〜3のいずれか1項に記載の方法。
- [5] 分泌型の酵素が、分泌型アルカリフォスファターゼである、請求項4に記載の方法。
- [6] 分泌型アルカリフォスファターゼが、耐熱性の分泌型アルカリフォスファターゼである、請求項5に記載の方法。
- [7] 分泌型アルカリフォスファターゼが、分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼである、請求項5に記載の方法。
- [8] 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼが、配列番号:11で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質である、請求項7に記載の方法。
- [9] 血中の分泌タンパク質量を測定することを特徴とする、請求項1〜8のいずれか1項に記載の方法。
- [10] 血中の分泌タンパク質量の測定が、酵素活性測定により行うものである、請求項9に記載の方法。
- [11] 酵素活性が、アルカリフォスファターゼ活性である、請求項10に記載の方法。
- [12] 細胞が、腫瘍細胞または不死化細胞である、請求項1〜11のいずれか1項に記載の方法。

- [13] 転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法であって、
(a) 分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルに化合物を投与する工程と、
(b) 請求項1〜12のいずれか1項に記載の方法により、前記化合物を投与された非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性を測定する工程と、
を含む、前記方法。
- [14] 転写活性に影響を与える化合物をスクリーニングする方法であって、
(a) 化合物を投与された非ヒト動物に分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を移植する工程と、
(b) 請求項1〜12のいずれか1項に記載の方法により、前記細胞を移植された非ヒト動物モデルにおける移植細胞中の転写活性を測定する工程と、
を含む、前記方法。
- [15] 非ヒト動物モデルにおける移植細胞数を測定する方法であって、転写制御配列及びそれに機能的に結合された分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルにおいて、当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標として移植細胞数を測定する、前記方法。
- [16] 分泌型タンパク質が、分泌型の酵素である請求項15に記載の方法。
- [17] 分泌型の酵素が、分泌型アルカリフォスファターゼである、請求項16に記載の方法。
- [18] 分泌型アルカリフォスファターゼが、耐熱性の分泌型アルカリフォスファターゼである、請求項17に記載の方法。
- [19] 分泌型アルカリフォスファターゼが、分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼである、請求項17に記載の方法。
- [20] 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼが、配列番号:11で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質である、請求項19に記載の方法。
- [21] 血中の分泌タンパク質量を測定することを特徴とする、請求項15〜20のいずれか1項に記載の方法。

- [22] 血中の分泌タンパク質量の測定が、酵素活性測定により行うものである、請求項21に記載の方法。
- [23] 酵素活性が、アルカリフォスファターゼ活性である請求項22に記載の方法。
- [24] 細胞が、腫瘍細胞または不死化細胞である、請求項15〜23のいずれか1項に記載の方法。
- [25] 転写制御配列が、恒常的転写制御配列を含むものである、請求項15〜24のいずれか1項に記載の方法。
- [26] 恒常的転写制御配列が、SV40プロモーター、CMVプロモーター、チミジンキナーゼプロモーター、Ubiquitin Cプロモーター、Elongation factor 1 alpha (EF1a) プロモーター、 β -actinプロモーター、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase プロモーター、Phosphoglycerokinaseプロモーター、 β 2-Microglobulinプロモーターおよび β -Glucuronidaseプロモーターからなる群から選択される少なくとも一つの配列である、請求項25に記載の方法。
- [27] 恒常的転写制御配列が、SV40プロモーターである、請求項25に記載の方法。
- [28] 恒常的転写制御配列が、配列番号:9で表される配列である、請求項25に記載の方法。
- [29] 移植細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングする方法であって、
(a) 分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルに化合物を投与する工程と、
(b) 請求項15〜28のいずれか1項に記載の方法により、前記化合物を投与された非ヒト動物モデルにおける移植細胞数を測定する工程と、
を含む、前記方法。
- [30] 移植細胞数に影響を与える化合物をスクリーニングする方法であって、
(a) 化合物を投与された非ヒト動物に分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を移植する工程と、
(b) 請求項15〜28のいずれか1項に記載の方法により、前記細胞を移植された非ヒト動物における移植細胞数を測定する工程と、

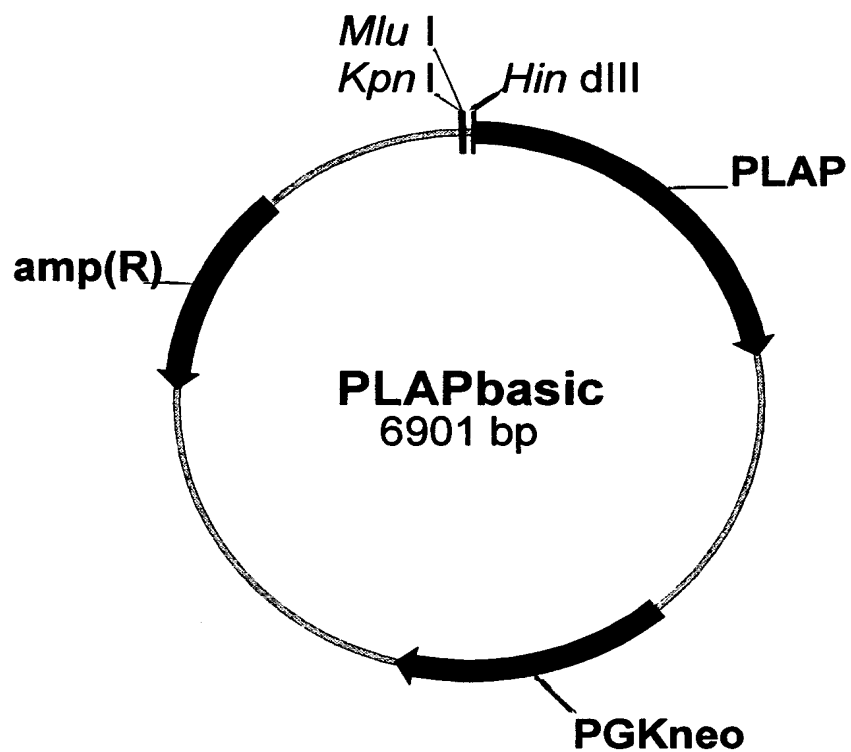
を含む、前記方法。

- [31] 非ヒト動物モデルにおける腫瘍体積を測定する方法であって、転写制御配列及びそれに機能的に結合された分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた腫瘍を生じ当該腫瘍において分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルにおいて、当該分泌タンパク質量を測定し、得られた分泌タンパク質量を指標として、腫瘍体積を測定する、前記方法。
- [32] 分泌型タンパク質が、分泌型の酵素である請求項31に記載の方法。
- [33] 分泌型の酵素が、分泌型アルカリフォスファターゼである、請求項32に記載の方法。
- [34] 分泌型アルカリフォスファターゼが、耐熱性の分泌型アルカリフォスファターゼである、請求項33に記載の方法。
- [35] 分泌型アルカリフォスファターゼが、分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼである、請求項33に記載の方法。
- [36] 分泌型胎盤由来アルカリフォスファターゼが、配列番号:11で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質である、請求項35に記載の方法。
- [37] 血中の分泌タンパク質量を測定することを特徴とする、請求項31〜36のいずれか1項に記載の方法。
- [38] 血中の分泌タンパク質量の測定が、酵素活性測定により行うものである、請求項37に記載の方法。
- [39] 酵素活性が、アルカリフォスファターゼ活性である請求項38に記載の方法。
- [40] 細胞が、腫瘍細胞または不死化細胞である、請求項31〜39のいずれか1項に記載の方法。
- [41] 転写制御配列が、恒常的転写制御配列を含むものである、請求項31〜40のいずれか1項に記載の方法。
- [42] 恒常的転写制御配列が、SV40プロモーター、CMVプロモーター、チミジンキナーゼプロモーター、Ubiquitin Cプロモーター、Elongation factor 1 alpha (EF1a) プロモーター、 β -actinプロモーター、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase プロモーター、Phosphoglycerokinaseプロモーター、 β 2-Microglobulinプロモーターおよび β

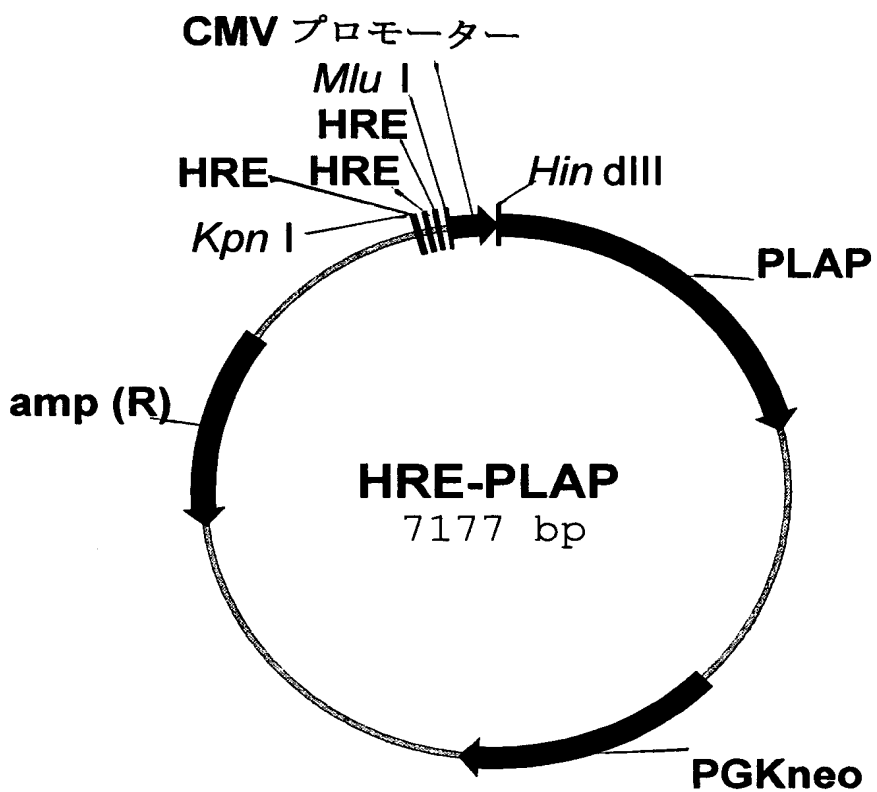
-Glucuronidaseプロモーターからなる群から選択される少なくとも一つの配列である、請求項41に記載の方法。

- [43] 恒常的転写制御配列が、SV40プロモーターである、請求項41に記載の方法。
- [44] 恒常的転写制御配列が、配列番号:9で表される配列である、請求項41に記載の方法。
- [45] 腫瘍体積に影響を与える化合物をスクリーニングする方法であって、
(a) 分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた腫瘍細胞を生じ当該腫瘍細胞において分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物モデルに化合物を投与する工程と、
(b) 請求項31〜44のいずれか一項に記載の方法により、前記化合物を投与された非ヒト動物モデルにおける腫瘍体積を測定する工程と、
を含む、前記方法。
- [46] 請求項1〜45のいずれか1項に記載の方法に用いるための、分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
- [47] 請求項1〜45のいずれか1項に記載の方法に用いるための、分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞。
- [48] 請求項1〜45のいずれか1項に記載の測定方法に用いるための、分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物。
- [49] 請求項1〜45のいずれか1項に記載の方法に用いるための、分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含有する測定キット。
- [50] 請求項1〜45のいずれか1項に記載の方法に用いるための、分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を含有する測定キット。
。
- [51] 請求項1〜45のいずれか1項に記載の方法に用いるための、分泌型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入された細胞を非ヒト動物に移植することによって得られた分泌型タンパク質を産生する非ヒト動物を含有する測定キット。

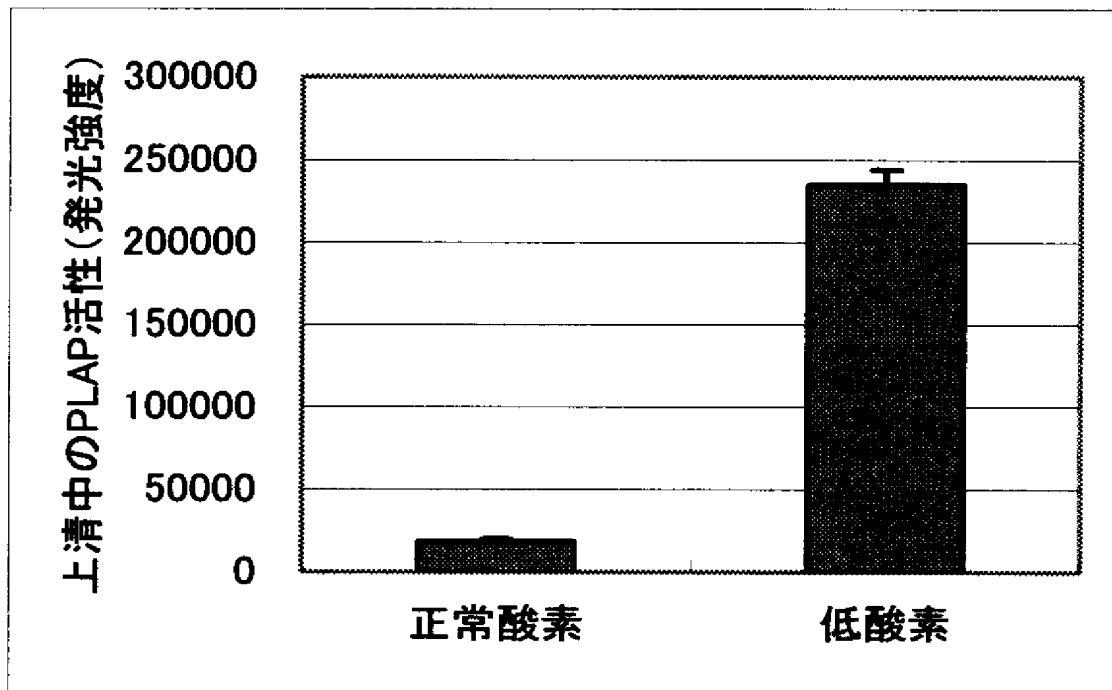
[図1]



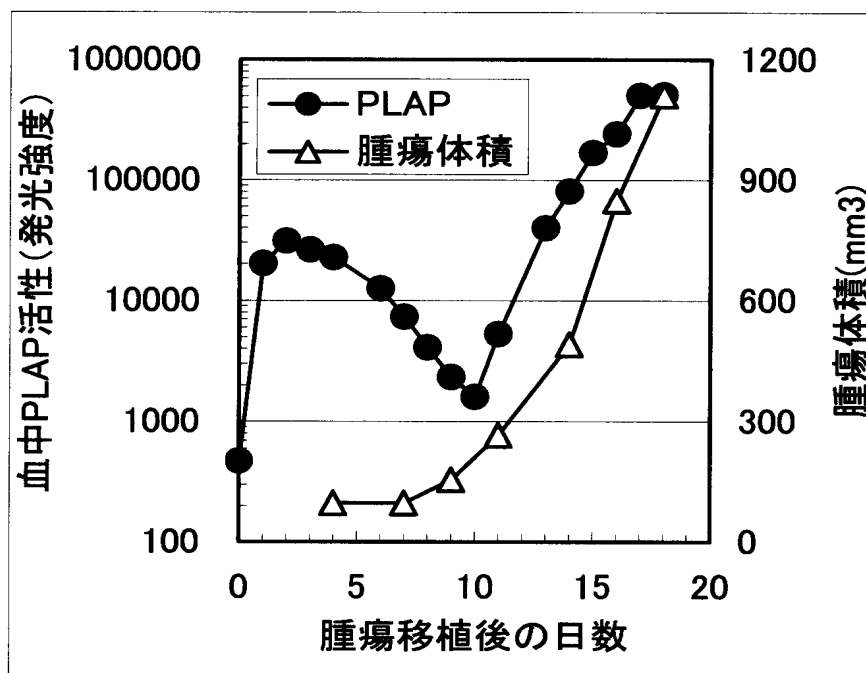
[図2]



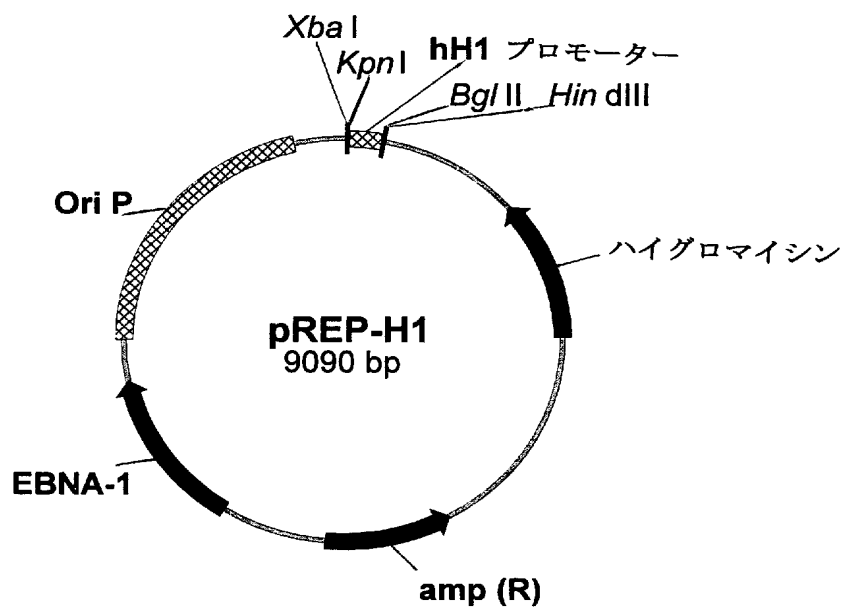
[図3]



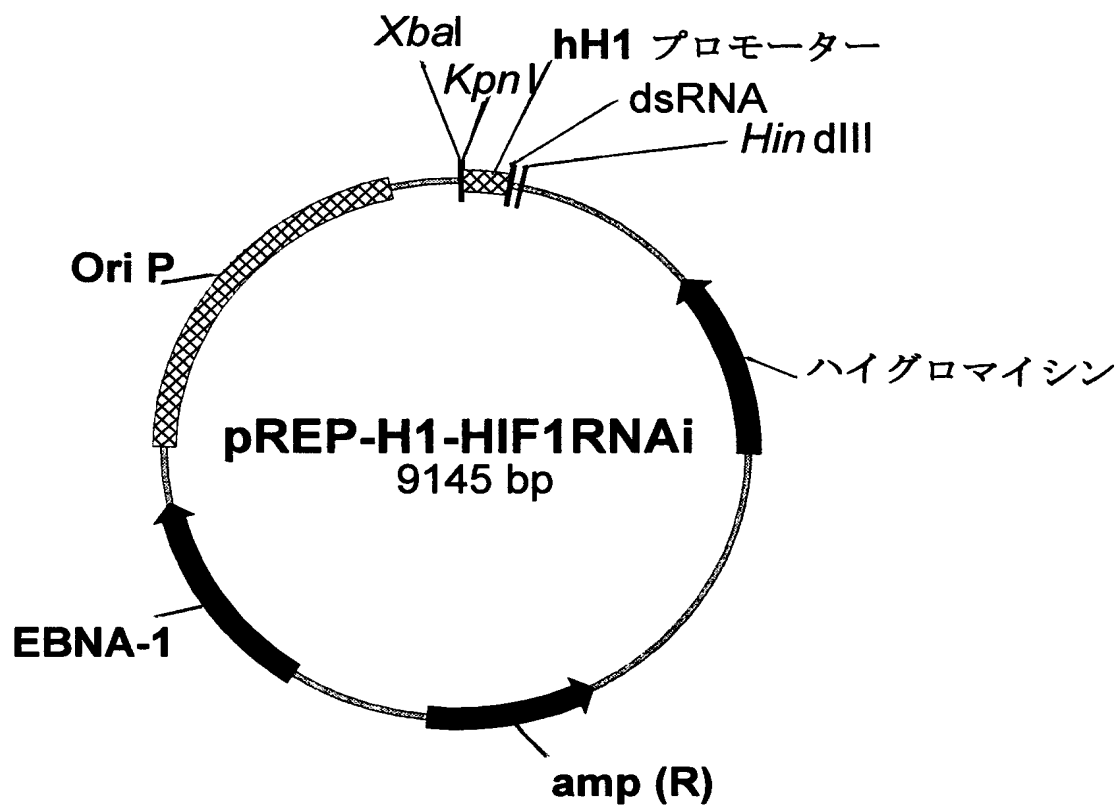
[図4]



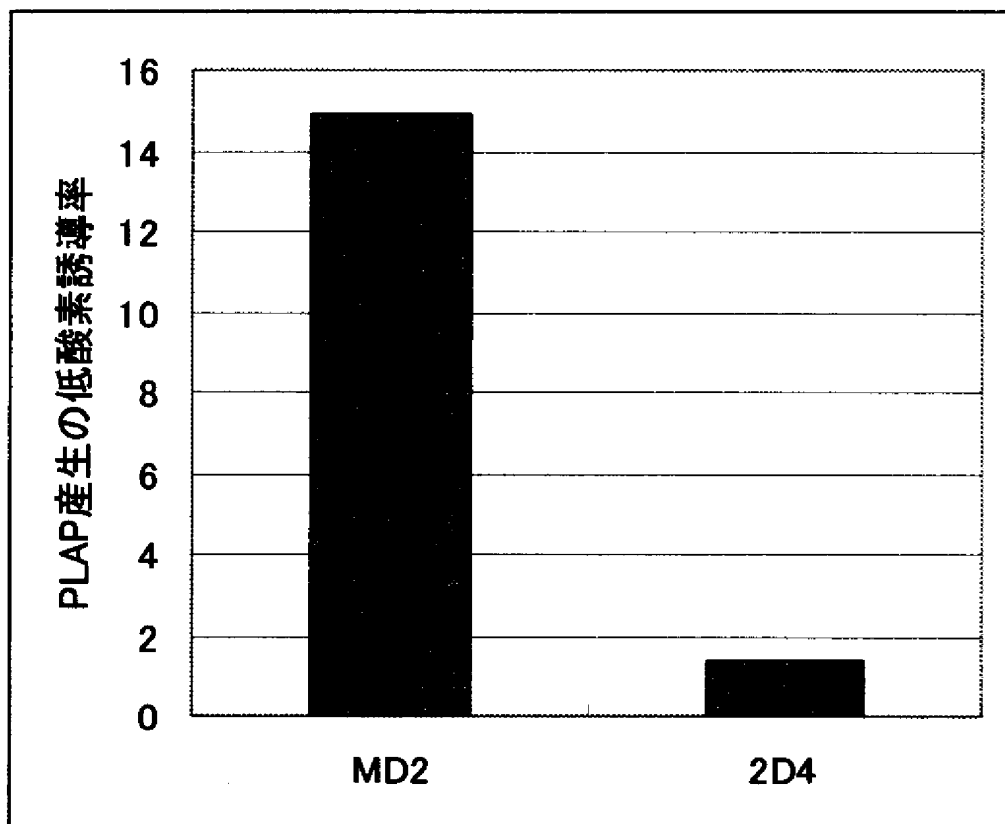
[図5]



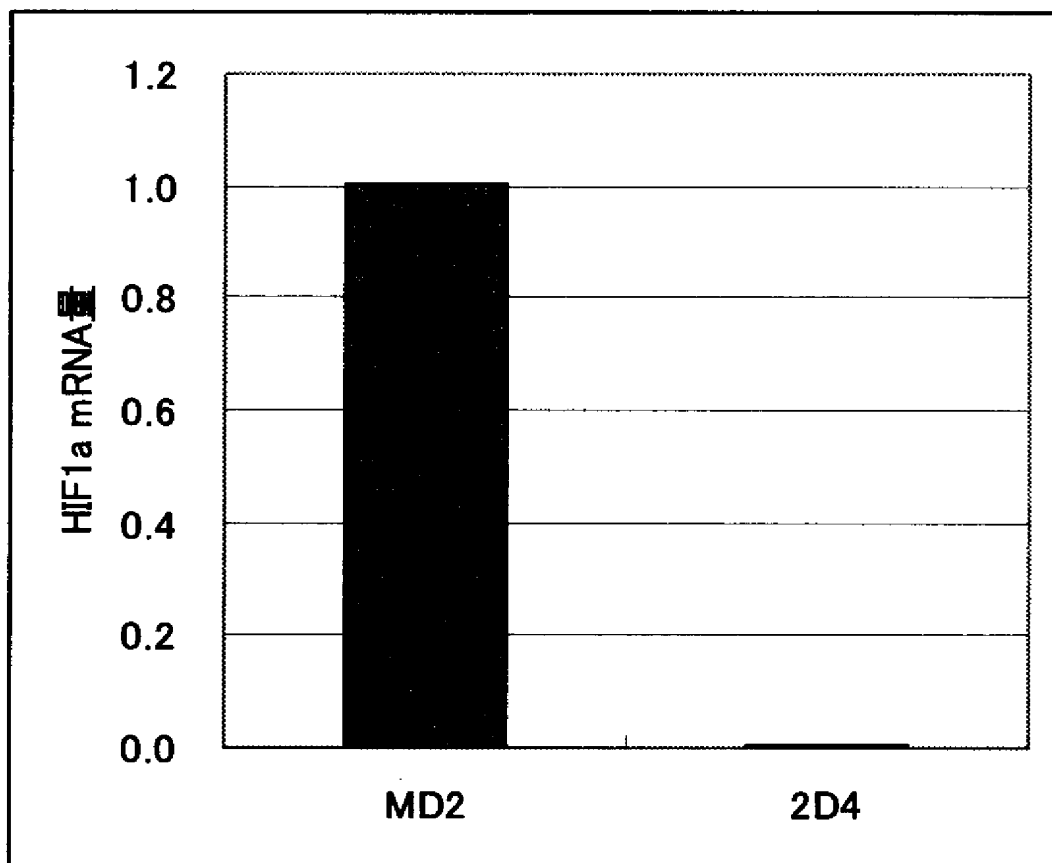
[図6]



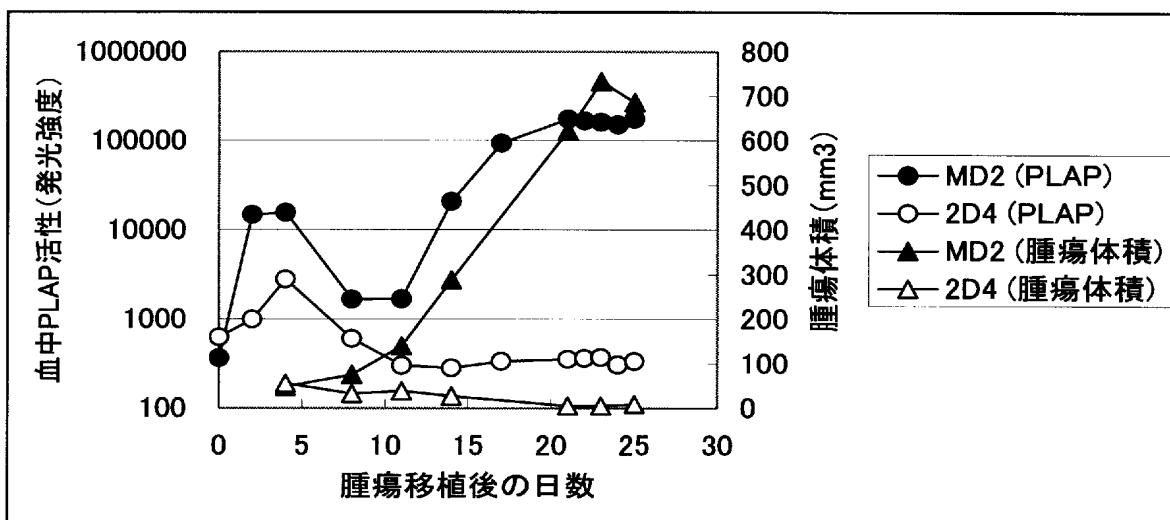
[図7]



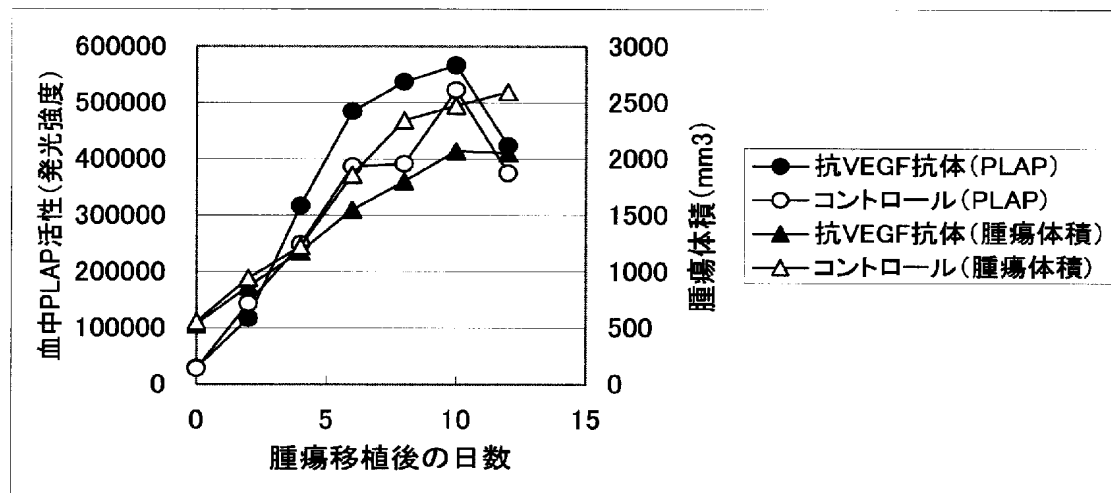
[図8]



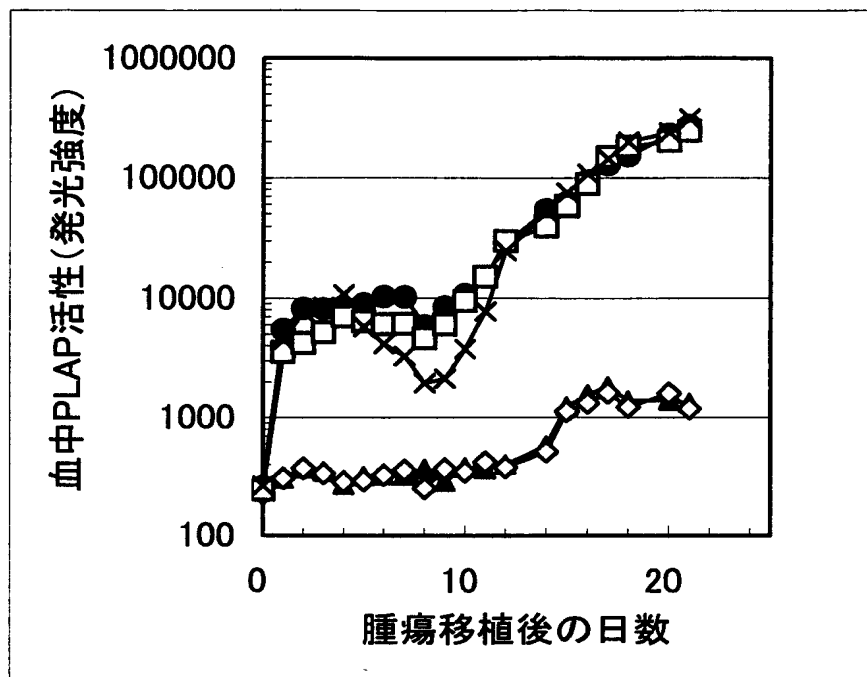
[図9]



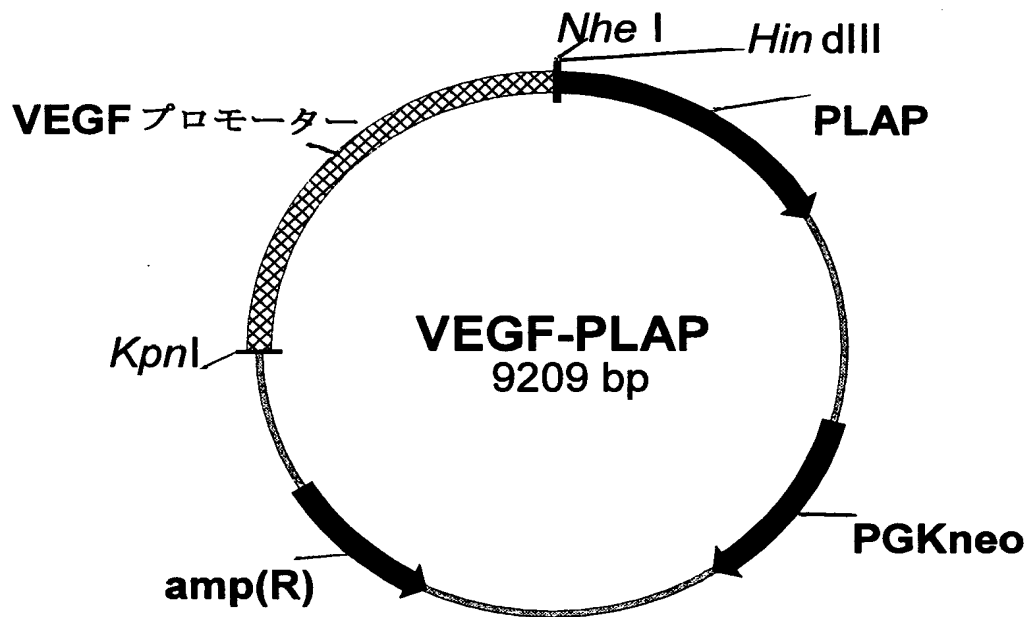
[図10]



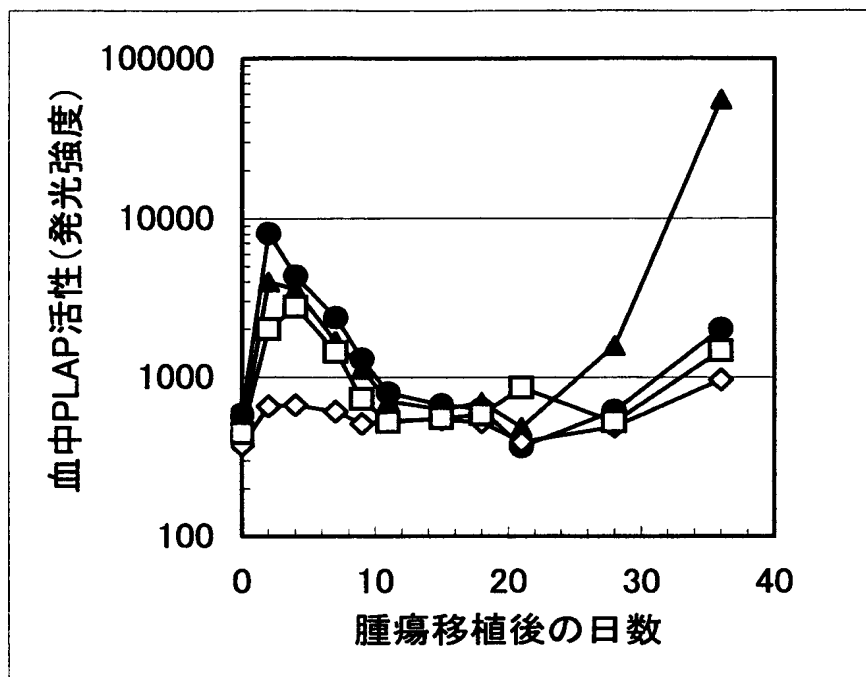
[図11]



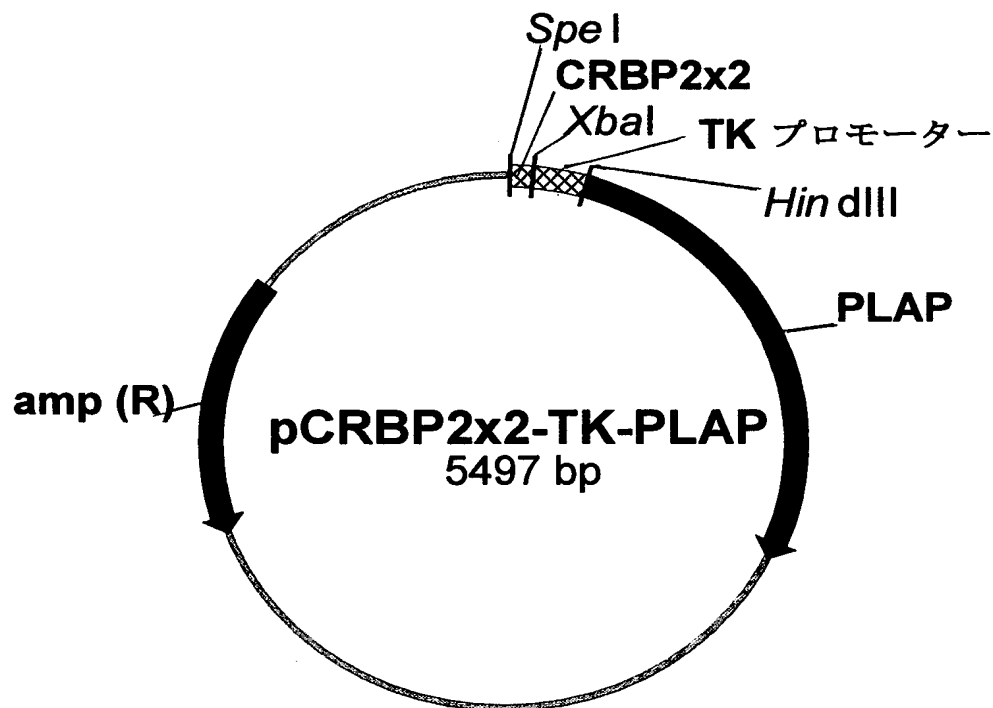
[図12]



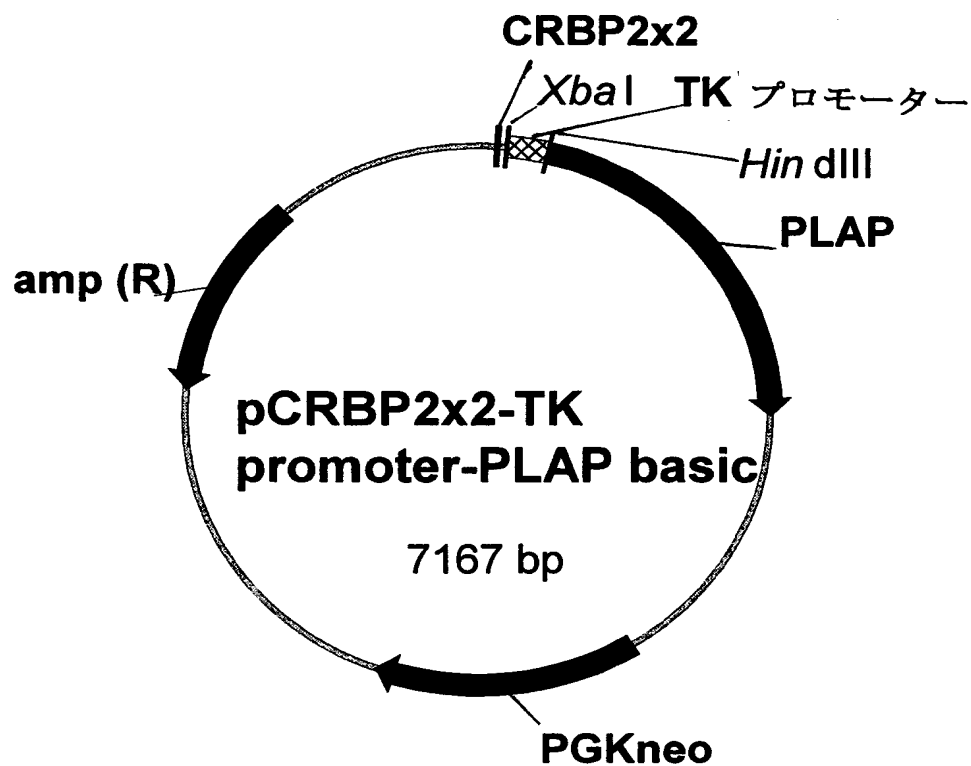
[図13]



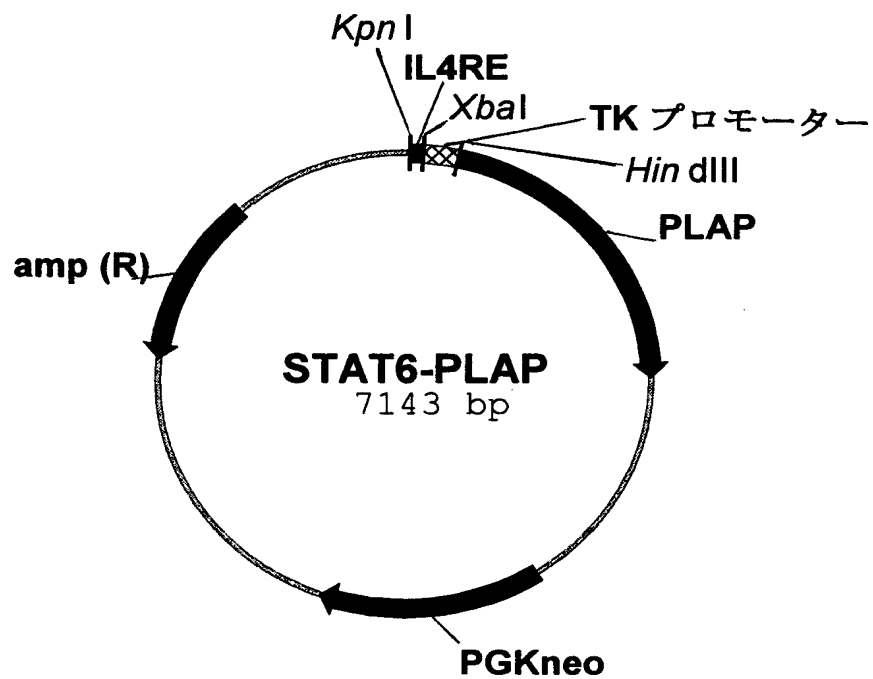
[図14]



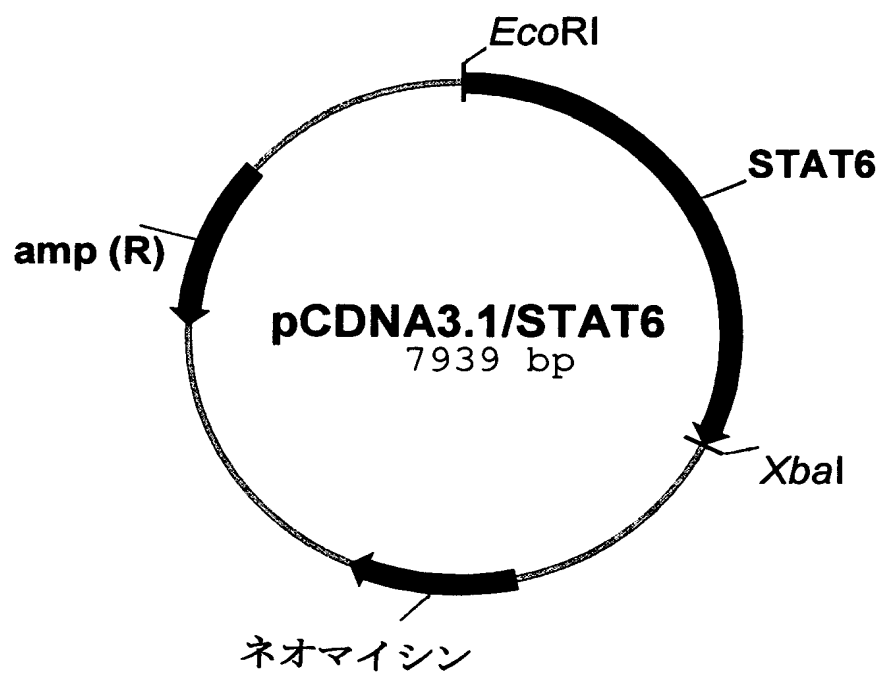
[図15]



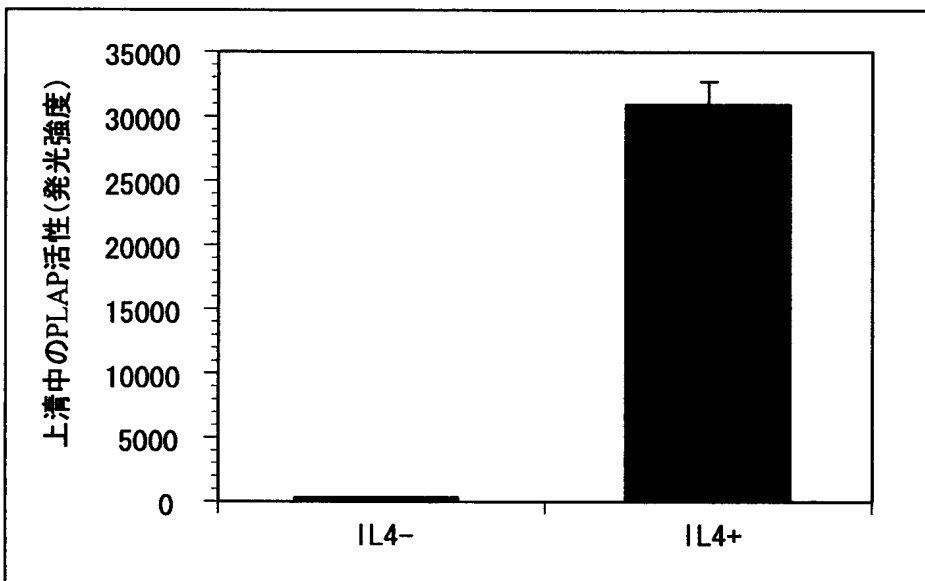
[図16]



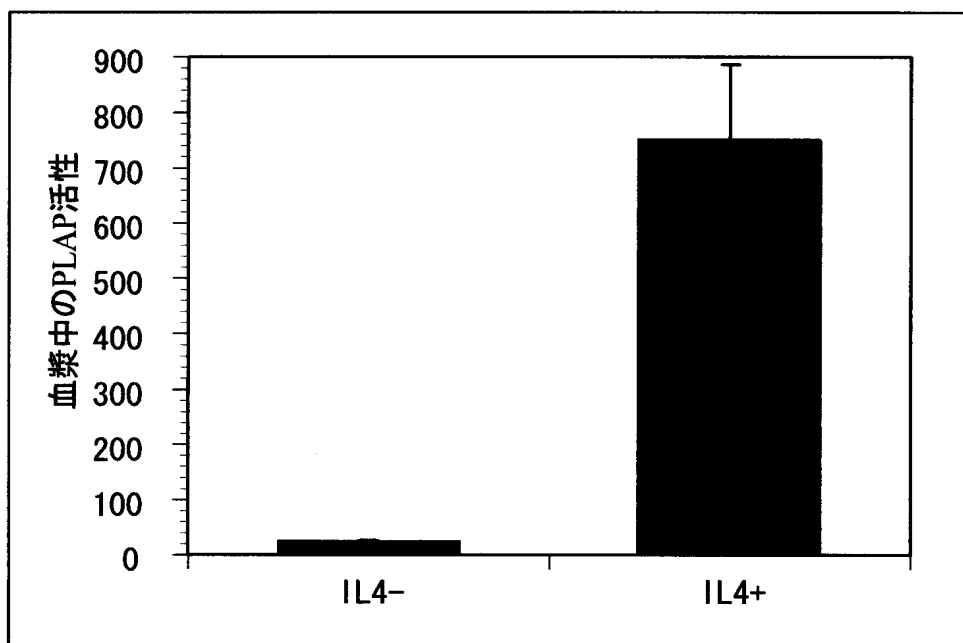
[図17]



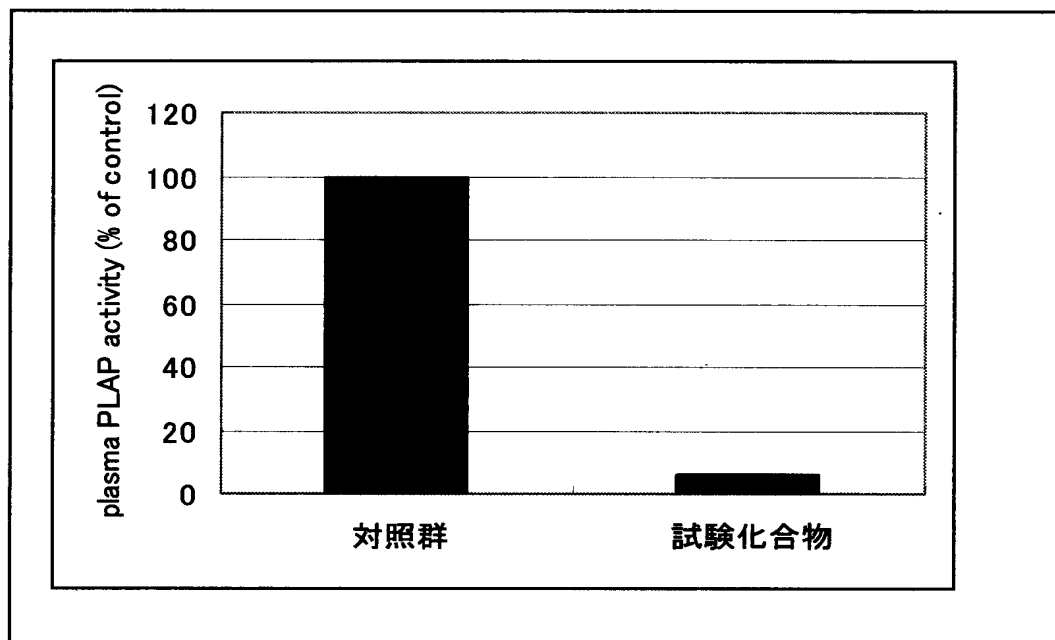
[図18]



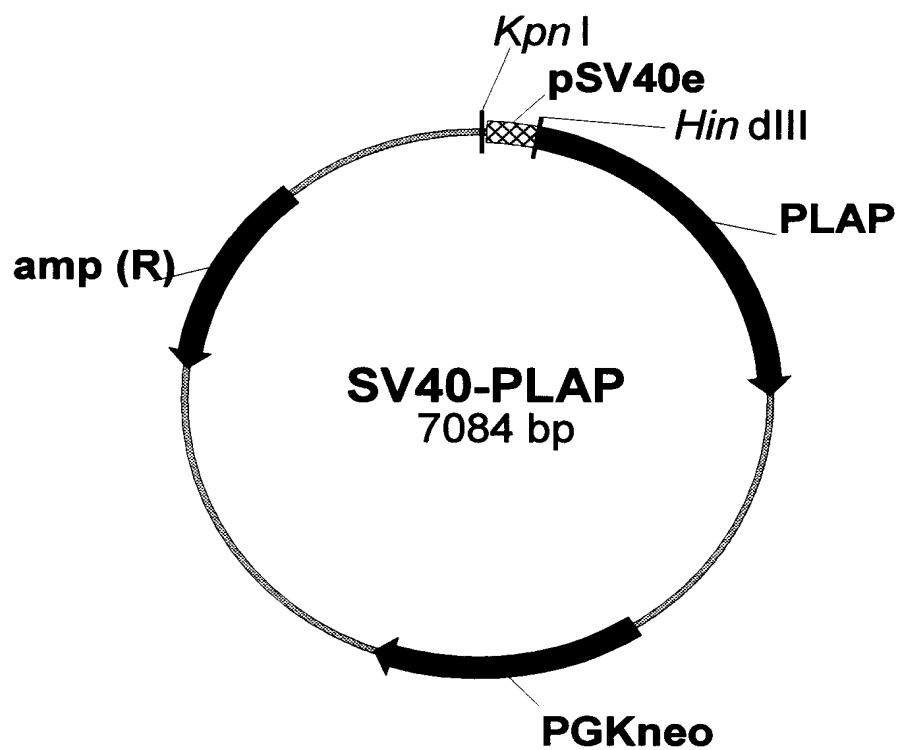
[図19]



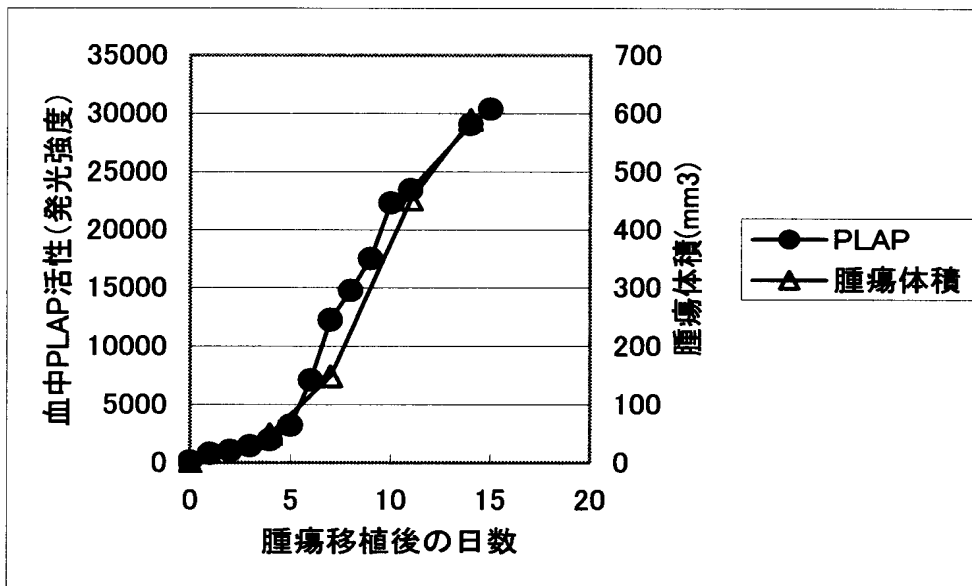
[図20]



[図21]



[図22]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005257

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/65, 15/55, A01K67/027, C12N5/10, C12Q1/42, G01N33/15,
33/50, 33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/52-15/66, A01K67/027, C12N5/10, C12Q1/42, G01N33/15,
33/50, 33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus, PUBMED

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	JOOSTEN C.E. et al., Production of a sialylated N-linked glycoprotein in insect cells: role of glycosidases and effect of harvest time on glycosylation, Biotechnol Prog. (2003), Vol.19, No.1, pages 193 to 201	<u>46-47</u> 1-45, 48-51
<u>X</u> A	BAO R. et al., Activation of cancer-specific gene expression by the survivin promoter, J Natl Cancer Inst. (2002), Vol.94, No.7, pages 522 to 528	<u>46-47</u> 1-45, 48-51
<u>X</u> A	LEE J.C. et al., A reporter-based assay for identifying hepatitis C virus inhibitors based on subgenomic replicon cells, J Virol Methods., 01 March, 2004 (01.03.04), Vol.116, No.1, pages 27 to 33	<u>46-47</u> 1-45, 48-51



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 June, 2005 (21.06.05)

Date of mailing of the international search report
12 July, 2005 (05.07.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005257

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YANG M. et al., Dual-color fluorescence imaging distinguishes tumor cells from induced host angiogenic vessels and stromal cells, Proc.Natl.Acad.Sci.USA. (2003), Vol.100, No.24, pages 14259 to 14262	1-51
A	SHINJI S. et al., External whole-body image of EGFP gene expression, J.Nippon Med.Sch. (2003), Vol.70, No.6, pages 462 to 463	1-51
A	BOUVET M. et al., Real-time optical imaging of primary tumor growth and multiple metastatic events in a pancreatic cancer orthotopic model, Cancer Res. (2002), Vol.62, No.5, pages 1534 to 1540	1-51

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C12N15/65, 15/55, A01K67/027, C12N5/10, C12Q1/42, G01N33/15, 33/50, 33/68		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C12N15/52-15/66, A01K67/027, C12N5/10, C12Q1/42, G01N33/15, 33/50, 33/68		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus, PUBMED		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	JOOSTEN C.E. et al., Production of a sialylated N-linked glycoprotein in insect cells: role of glycosidases and effect of harvest time on glycosylation, Biotechnol Prog. (2003), Vol.19, No.1, p.193-201	46-47 1-45, 48-51
X A	BAO R. et al., Activation of cancer-specific gene expression by the survivin promoter, J Natl Cancer Inst. (2002), Vol.94, No.7, p.522-528	46-47 1-45, 48-51
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 21.06.2005	国際調査報告の発送日 12.7.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 上條 肇 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 9453

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	LEE J.C. et al., A reporter-based assay for identifying hepatitis C virus inhibitors based on subgenomic replicon cells, J Virol Methods. (2004-Mar-1), Vol.116, No.1, p.27-33	46-47 1-45, 48-51
A	YANG M. et al., Dual-color fluorescence imaging distinguishes tumor cells from induced host angiogenic vessels and stromal cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2003), Vol. 100, NO. 24, p. 14259-14262	1-51
A	SHINJI S. et al., External whole-body image of EGFP gene expression, J. Nippon Med. Sch. (2003), Vol. 70, No. 6, p. 462-463	1-51
A	BOUVET M. et al., Real-time optical imaging of primary tumor growth and multiple metastatic events in a pancreatic cancer orthotopic model, Cancer Res. (2002), Vol. 62, No. 5, p. 1534-40	1-51